



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

## **FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

### **DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

---

*Trabajo de Tesis Doctoral*

***“Caracterización funcional del módulo de unión a  
carbohidratos presente en el gen de expansina 1 (LeExp1) de  
tomate. Efecto de su sobreexpresión sobre la calidad y el  
ablandamiento del fruto”***

---

---

*Tesista:* **Lic. Mauro Alejandro Perini**

*Director:* **Dr. Pedro Marcos Civello**

*Codirector:* **Dr. Gustavo Adolfo Martinez**

*Marzo 2017*

La presente tesis doctoral se encuentra inscripta (Exp. N° 0700-011978/000-2012) en la carrera de doctorado para acceder al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en el área Ciencias Biológicas (cat. A Res. 747/13 acreditada por la CONEAU y reconocida oficialmente por el Ministerio de Educación de la Nación Argentina, en la Res. 853).

## **PUBLICACIONES**

### **➤ Trabajos inherentes al plan de tesis publicados en revistas internacionales con referato**

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Natalia M. Villarreal, María Marina, Ann L. Powell, Gustavo A. Martinez y P. Marcos, Civello.

*“Overexpression of the carbohydrate binding module from Solanum lycopersicum Expansin 1 (Sl-EXP1) modifies tomato fruit firmness and Botrytis cinerea susceptibility”*. Plant Physiology and Biochemistry. (2017). **113**, 122–132.

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Gustavo A. Martinez y P. Marcos, Civello.

*“Measurement of expansin activity and plant cell wall creep by using a commercial texture analyzer”*. Electronic journal of biotechnology. (2017). **26**, 12-19.

### **➤ Trabajos inherentes al plan de tesis publicados en congresos o jornadas**

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Gustavo A. Martinez, P. Marcos, Civello. *“Efecto de la sobreexpresión del CBM del gen de expansina 1 (LeExp1) de Solanum lycopersicum en la maduración del fruto.”*. VIII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha 2015. 10, 11 y 12 de noviembre 2015. Balcarce, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster, ponencia oral a cargo del Dr. P.Marcos Civello y publicado en Actas del Congreso ISBN 978-987-45726-2-2 (versión impresa).

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Gustavo A. Martinez, P. Marcos, Civello. *“Efecto de la sobreexpresión del CBM del gen de expansina 1 (LeExp1) de tomate sobre la calidad y el ablandamiento del fruto”*. I Jornadas Jóvenes Investigadores del CISAV. 26 de Marzo de 2015 La Plata, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Comunicación oral a cargo de Mauro A. Perini y publicado en la revista Investigación joven (Vol. 2 Núm. 1) (revista electrónica) (ISBN 2314-3991).

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Gustavo A. Martinez, P. Marcos, Civello. *“Uso de un texturómetro comercial para: medidas de crecimiento ácido en diferentes condiciones y matrices, determinar actividad expansina sobre Fragaria x ananassa.”*. XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal y XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. 21-24 de Septiembre de 2014 Mar del Plata,

Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster y trabajo publicado en Actas del Congreso. (ISBN: 978-987-544-592-5 (E-book); 978-987-544-591-8 (Papel)). Pág. 76.

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Gustavo A. Martinez, P. Marcos, Civello. “*Determinación de la actividad expansina durante la maduración en cultivares de frutilla (Fragaria x ananassa)*”. VII Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Postcosecha 2014. 28-30 de Mayo de 2014 La Plata, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster y trabajo publicado en Actas del Congreso. (ISBN: 978-950-34-1094-3)

**Mauro A. Perini**, Ignacio N. Sin, Gustavo A. Martinez, P. Marcos, Civello. “*Adaptacion de un texturometro comercial para realizar medidas de crecimiento ácido y actividad de expansina*”. XV Jornadas Anuales SAB 2013. Sociedad Argentina de Biología. 4-5 de Diciembre de 2013 Chascomús, Buenos Aires, Argentina. **Participación:** Poster y publicado en BIOCELL 38 (Suppl. 2), 2014 ISSN 0327-9545 (versión impresa) ISSN 1667-5746 (versión online).

## **AGRADECIMIENTOS**

A las cuatro patas de mi familia, mi mamá, papá, hermana y abuelos;

A mi compañera de vida, *Agus*;

A mi amigo de ruta, *Nacho*;

A mi director, *Marcos*, por su apoyo permanente y por todas las charlas que tuvimos, tenemos y tendremos;

A mi co-director, *Gustavo*, por su apoyo;

A mis amigos de la vida, *Mati, Rafita, Euge, Tita, Ger, Pau*;

A mis amigos de la UB4', *Peque, Core, Vicky, Andre*;

Al club del café, *Hernán y Marina*;

Al INFIVE, que me brindo el espacio para realizar mi trabajo de tesis;

Al personal de INFIVE, técnicos (*Tati, Santi*), becarios, investigadores; todos de alguna manera u otra han colaborado conmigo;

A *Ann Powell*, por darme la oportunidad de conocer nuevos horizontes académicos;

Al CONICET por brindarme el financiamiento para poder realizar mi tesis;

A la *catedra* de Introducción a la Química y Química General de la Facultad de Ciencias Exactas (FCE-UNLP);

A mi querida *facultad*, siempre seré parte de ella.

## ÍNDICE

<i>Neologismos y abreviaturas</i> .....	I
<i>Resumen</i> .....	III

### **1. INTRODUCCIÓN GENERAL** **1-32**

#### *1.1. El tomate* ..... 2-10

1.1.1. Origen del cultivo y consumo .....	2
1.1.2. Taxonomía y morfología.....	3
1.1.3. Importancia del cultivo de tomate.....	4
1.1.3.1. El tomate en el mundo .....	5
1.1.3.2. El tomate en la Argentina .....	6
1.1.3.2.1. El tomate en la ciudad de La Plata .....	7
1.1.4. Problemas poscosecha en la producción de tomate fresco .....	8

#### *1.2. La célula vegetal y su pared celular primaria* ..... 10-20

1.2.1. La pared celular vegetal primaria .....	12
1.2.2. Componentes de la pared celular vegetal .....	13
1.2.2.1. Polisacáridos .....	13
1.2.2.2. Proteínas estructurales y proteínas solubles .....	15
1.2.3. Modelo de pared celular vegetal primaria .....	17

#### *1.3. Expansinas* ..... 20-25

1.3.1. Aspectos generales.....	20
1.3.2. Mecanismo de acción.....	23
1.3.3. Función de las expansinas.....	24

#### *1.4. Desarrollo y maduración del fruto de tomate* ..... 25-32

1.4.1. Las expansinas en el ablandamiento del fruto de tomate .....	31
--	----

### **2. OBJETIVOS** **33-34**

#### *2.1. Objetivos específicos* ..... 34

### **3. CAPÍTULO I: “Adaptación metodológica para la medida de la actividad expansina usando un texturómetro comercial”**

**35-64**

3.1. Antecedentes específicos .....	36-37
3.2. Objetivos específicos .....	38

3.3.	<i>Materiales y métodos</i>	39-47
3.3.1.	Material vegetal	39
3.3.1.1.	Matriz vegetal	39
3.3.1.2.	Extractos proteicos	39
3.3.2.	Medida de crecimiento ácido de la pared celular y actividad expansina	41
3.3.2.1.	Acondicionamiento de los hipocótilos	41
3.3.2.2.	Ensayo de crecimiento ácido de la pared celular	41
3.3.2.3.	Ensayo de la determinación de la actividad expansina	43
3.3.2.4.	Obtención de extractos proteicos	45
3.3.2.4.1.	Hipocótilos de pepino	45
3.3.2.4.2.	Frutos de frutillas	46
3.3.2.4.3.	Frutos de tomate	46
3.3.2.5.	Cuantificación de proteínas	47
3.3.3.	Análisis estadístico	47
3.4.	<i>Resultados</i>	48-58
3.4.1.	Ensayos de crecimiento ácido de la pared celular	48
3.4.2.	Efecto de agentes químicos en el crecimiento ácido de la pared celular	51
3.4.3.	Determinación de la actividad expansina	52
3.4.3.1.	Determinación de actividad expansina en diferentes estadios de madurez de tomate	55
3.4.3.2.	Actividad expansina: modos de expresión	56
3.5.	<i>Discusión</i>	59-64
4.	<b>CAPÍTULO II: “Caracterización de las propiedades de unión in vitro de CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1”</b>	<b>65-112</b>
4.1.	<i>Antecedentes específicos</i>	66-68
4.2.	<i>Objetivos específicos</i>	69
4.3.	<i>Materiales y métodos</i>	70-81
4.3.1.	Análisis in silico y clonado molecular	70
4.3.1.1.	Análisis secuencial	71
4.3.2.	Transformación en E. coli (pLys) y expresión heteróloga	72
4.3.2.1.	Generación de células competentes	72
4.3.2.2.	Transformación de las células competentes	73
4.3.2.3.	Expresión heteróloga	73
4.3.3.	Purificación de las proteínas recombinantes	74

4.3.4. SDS-PAGE e Inmuno-detección .....	75
4.3.5. Ensayo de replegado de las proteínas recombinantes.....	76
4.3.6. Ensayo de estabilización de las proteínas recombinantes ..	77
4.3.7. Ensayos de unión.....	79
4.3.8. Análisis estadístico.....	81
4.4. <i>Resultados</i> .....	82-105
4.4.1. Clonado y expresión de <i>CBM-SIEXPA1</i> , <i>EXP-SIEXPA1</i> y <i>SIEXPA1</i> .....	82
4.4.2. Purificación de <i>CBM-SIEXPA1</i> , <i>EXP-SIEXPA1</i> y <i>SIEXPA1</i> .....	84
4.4.3. Ensayo de replegado de las proteínas en diferentes condiciones.....	88
4.4.4. Ensayos de estabilización de las proteínas con diferentes agentes estabilizantes.....	90
4.4.4.1. Ensayo de estabilización con ácido poligalacturónico (APG) .....	90
4.4.4.2. Ensayo de estabilización con carboximetilcelulosa (CMC) .....	97
4.4.4.3. Ensayo de estabilización con ácido desoxirribonucleico (ADN).....	99
4.4.4.4. Ensayo de estabilización/solubilización con urea .....	101
4.4.5. Ensayos de Unión .....	103
4.5. <i>Discusión</i> .....	106-112
<b>5. CAPÍTULO III: “Efecto de la sobreexpresión del <i>CBM-SIEXPA1</i> sobre plantas y frutos de tomate”</b>	<b>113-182</b>
5.1. <i>Antecedentes específicos</i> .....	114-116
5.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	117
5.3. <i>Materiales y métodos</i> .....	118-129
5.3.1. Clonado de <i>CBM-SIEXPA1</i> y generación del constructo ..	118
5.3.2. Transformación de las plantas .....	120
5.3.3. Material vegetal y condiciones de cultivo .....	121
5.3.4. Extracción de ARN y caracterización genotípica de las plantas .....	121
5.3.5. Caracterización fenotípica de las plantas.....	123
5.3.5.1. Altura del tallo principal y número de racimos florales y flores .....	123
5.3.5.2. Área foliar y medida de SPAD .....	123
5.3.6. Caracterización de las propiedades mecánicas de las	



hojas compuestas .....	124
5.3.7. Determinación de parámetros de calidad del fruto .....	125
5.3.7.1. Determinación de sólidos solubles .....	125
5.3.7.2. Acidez titulable y pH.....	125
5.3.8. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular .....	126
5.3.8.1. Extracción y cuantificación de pectinas, hemicelulosas y celulosa.....	126
5.3.9. Ensayo poscosecha .....	129
5.3.9.1. Determinación de la firmeza del fruto .....	129
5.3.9.2. Cuantificación del color superficial .....	130
5.3.9.3. Pérdida de peso .....	131
5.3.10. Análisis estadístico.....	131
5.4. <i>Resultados</i> .....	132-160
5.4.1. Clonado y transformación de plantas.....	132
5.4.2. Análisis de la expresión del ARNm del CBM- SIEXPA1 .....	133
5.4.3. Caracterización fenotípica de las plantas sobreexpresantes de <i>CBM-SIEXPA1</i> .....	135
5.4.4. Efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre algunos parámetros de calidad (pH, acidez titulable, sólidos solubles y azúcares totales).....	139
5.4.5. Efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre la susceptibilidad a la infección por <i>Botrytis cinérea</i> .....	145
5.4.6. Efecto de la sobreexpresión CBM-SIEXPA1 en el contenido de pared celular.....	146
5.4.6.1. Efecto de la sobreexpresión del CBM-SIEXPA1 sobre las fracciones de pared celular .....	149
5.4.7. Determinación del efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre la actividad expansina .....	164
5.4.8. Análisis del efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 en el almacenamiento bajo condiciones controladas (ensayo de poscosecha) .....	167
5.5. <i>Discusión</i> .....	171-182
<b>6. <u>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</u></b> .....	<b>183-186</b>
6.1. <i>Conclusiones generales</i> .....	184-185
6.2. <i>Perspectivas</i> .....	186
<b>7. <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	<b>187-201</b>

## NEOLOGISMOS Y ABREVIATURAS

**$\alpha$ -Aras:**  $\alpha$ -arabinofuranosidasas

**$\beta$ -Gal:**  $\beta$ -galactosidasa

**$\beta$ -Masas:**  $\beta$ -mananasas

**$\beta$ -Xil:**  $\beta$ -xilosidasa

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**APG:** ácido poligalacturónico

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNasa:** ribonucleasa

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BSA:** albúmina sérica bovina

**Buffer:** Solución amortiguadora, Tampón.

**CMC:** carboximetil celulosa

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DTT:** ditionitroreitol

**EDTA:** ácido etilendiamintetracético

**EGasas:** endoglucanasas

**EXLA:** Expansina-like  $\alpha$

**EXLB:** Expansina-like  $\beta$

**EXnasas:** Endo-xilanasas

**EXPA:**  $\alpha$ -expansinas

**EXPB:**  $\beta$ -expansinas

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

**INDEC:** Instituto Nacional de Estadística y Censos de Argentina

**IPTG:** isopropil-tio- $\beta$ -D-galactósido

**LB:** medio Luria-Bertani

**M-MLV:** virus de la leucemia murina transcriptasa reverse

**NCBI:** Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Centre for Biotechnology Information*)

**Northern-blot:** técnica para medir cantidad y tamaño aproximado de un transcripto específico en una mezcla compleja mediante hibridación a una sonda complementaria de ADN o ARN marcada.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

**RT-qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real

**PEG:** polietilenglicol

**PG:** poligalacturonasa

**PEL:** pectato liasa

**PME:** pectin metilesterasa

**PVP:** polivinilpirrolidona

**RG I:** Ramnogalacturonanos I

**RG II:** Ramnogalacturonanos II

**SDS:** dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE:** electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

**Western-blot:** técnica para detectar proteínas específicas de una mezcla mediante reconocimiento con un anticuerpo específico.

**XETs:** Xiloglucano endotransglicosilasas

**Xlns:** xilanasas

## RESUMEN

En Argentina, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es la quinta hortaliza a nivel de producción, siendo el cinturón hortícola de la ciudad de La Plata uno de los principales productores de tomate fresco para consumo de la Provincia de Buenos Aires. Un aspecto clave para optimizar el aprovechamiento de la producción es mejorar los aspectos ligados a la conservación poscosecha (periodo de almacenamiento del producto previo al consumo en fresco), lo cual requiere de un conocimiento detallado de los procesos metabólicos que ocurren durante la maduración y senescencia. La *firmeza*, uno de los principales determinantes de la calidad poscosecha y la vida útil de los frutos, está determinada por la resistencia mecánica impuesta por la pared celular.

Las *expansinas* (proteínas sin actividad hidrolítica conocida) están implicadas en el desmantelamiento, no hidrolítico, de las paredes celulares vegetales, particularmente en procesos en los que es necesaria la relajación de la pared, como el desarrollo y la maduración de los frutos. Como muchas proteínas asociadas a carbohidratos, las expansinas tienen un dominio catalítico putativo y un módulo de unión a carbohidratos (CBM). Se cree que el CBM actuaría anclando a la expansina a la superficie de la celulosa, mientras que el dominio catalítico putativo interactuaría con las hemicelulosas en la superficie de las microfibrillas provocando la ruptura de los enlaces no covalentes, principalmente puentes de hidrógeno, existentes entre la celulosa y las hemicelulosas de la matriz. Tomate incluye 38 genes de expansinas pertenecientes a diferentes grupos filogenéticos. Estudios previos han demostrado que existe una expansina específica de fruto, la  $\alpha$ -expansina 1 de tomate (*SIEXPA1*).

La determinación de la actividad expansina depende de la medición de la capacidad de extensión de paredes celulares aisladas mediante el uso de extensómetros "*ad hoc*" poco convencionales, hecho que ha restringido fuertemente su estudio. Esto nos impulsó a adaptar una metodología para medir la extensión de la pared celular y la actividad expansina usando un medidor de textura comercial, equipo común encontrado en laboratorios de ciencia de los alimentos o tecnología poscosecha. Fue posible medir el crecimiento ácido de hipocótilos de pepino y de tomate, así como determinar la actividad expansina sobre extractos de proteínas de hipocótilos de

pepino, de frutos frutilla y de frutos de tomate en diferentes estadios de madurez, de manera fiable y reproducible.

Por otro lado, haciendo uso de un sistema de expresión heterólogo (*Escherichia coli*), se sobreexpresaron tanto la proteína completa (SIEXPA1) como sus dominios característicos (CBM-SIEXPA1 y EXP-SIEXPA1), con la finalidad de analizar de manera integral el mecanismo de unión sobre diversos sustratos sintéticos de la pared celular vegetal. Se demostró, a través de ensayos de unión “*in vitro*”, que tanto la proteína completa como ambos dominios se unen a celulosa microcristalina y xilano de avena. Para el caso de la celulosa la unión es mayor para la proteína completa y el dominio CBM, mientras que para el caso del xilano la unión es mayor para la proteína completa y el dominio catalítico putativo. Asimismo, se demostró que dichas proteínas no poseen afinidad por un sustrato no presente en la pared celular como lo es el almidón.

Por último, se sobreexpresó de manera constitutiva el CBM de la expansina 1 de *Solanum lycopersicum* (CBM-SIEXPA1) en la pared celular de plantas de tomate, siendo ésta la primera vez que un CBM se sobreexpresa en un fruto destinado a controlar la degradación de la pared celular y el ablandamiento del fruto. La sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 genera un aumento de la resistencia mecánica de las hojas, un retardo en el proceso de ablandamiento del fruto, una reducción en la susceptibilidad al ataque por *Botrytis cinerea* y un aumento en su contenido de pared celular; mientras que no modifica el crecimiento de las plantas y el fenotipo general, y no altera los parámetros de calidad característicos del fruto.

La presente tesis aborda desde diferentes aproximaciones el estudio de una proteína en particular. Se concluye que, la fácil adaptación metodológica para la determinación de la actividad expansina podría contribuir a facilitar y aumentar el análisis de las propiedades de las expansinas en diferentes sistemas; las  $\alpha$ -expansinas, apoyando resultados previos, se unirían a través del dominio CBM a celulosa mientras que el dominio catalítico putativo intervendría en la relajación de la matriz de hemicelulosa con la consecuente relajación de la pared vegetal; la sobreexpresión de un CBM en la pared celular sería una estrategia factible de utilizar para lograr aumentar la vida poscosecha de frutos carnosos, como lo es el tomate, sin alterar el crecimiento de la planta.

# ***1. INTRODUCCIÓN***

## ***GENERAL***

## **1.1. EL TOMATE**

### **1.1.1. Origen del cultivo y consumo**

El tomate cultivado deriva del tomate cherry (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme), el cual crece de manera salvaje mayoritariamente en Perú, Ecuador y zonas tropicales de América. Se cree que los primeros pueblos en domesticar su cultivo habrían sido los habitantes de la región azteca donde actualmente se encuentra México, y su nombre deriva de la palabra azteca "*xitomatl*" (Prance y Nesbitt, 2006).

Fue recién a principios del siglo XVI que los españoles llevaron este vegetal a Europa, donde inicialmente fue considerado como una planta venenosa conocida como "*Pomme d'amour*", "*manzana del amor*" y "*manzana de oro*". Esto pudo haber sido en parte debido al color de sus frutos y en parte porque se relacionaron con plantas venenosas de la familia de la morena. La barrera culinaria parece haberse roto primero en Italia, y poco a poco el gusto por comer estos frutos se extendió por el Mediterráneo y luego hacia el norte a través de Europa, donde fueron tratados durante mucho tiempo con sospecha (Prance y Nesbitt, 2006, Vaughan y Geissler, 2009).

La producción a gran escala parece haber comenzado en Italia, en la región cercana a Nápoles, a principios del siglo XIX. Sin embargo, no fue hasta finales del siglo XIX y principios del siglo XX que el cultivo del tomate se convirtió en un gran negocio en Europa, cuando los tomates fueron incorporados en la mayoría de las ensaladas y la salsa de tomate fue un ingrediente reconocido a nivel mundial. (Prance y Nesbitt, 2006).

Asimismo, durante el siglo XVIII el tomate fue introducido a los Estados Unidos desde Europa, donde paulatinamente se fue dando lugar a una industria de productos

de conserva. También fueron introducidos gradualmente en otras partes del mundo, convirtiéndose hoy en uno de los frutos de mayor demanda a nivel mundial (Prance y Nesbitt, 2006).

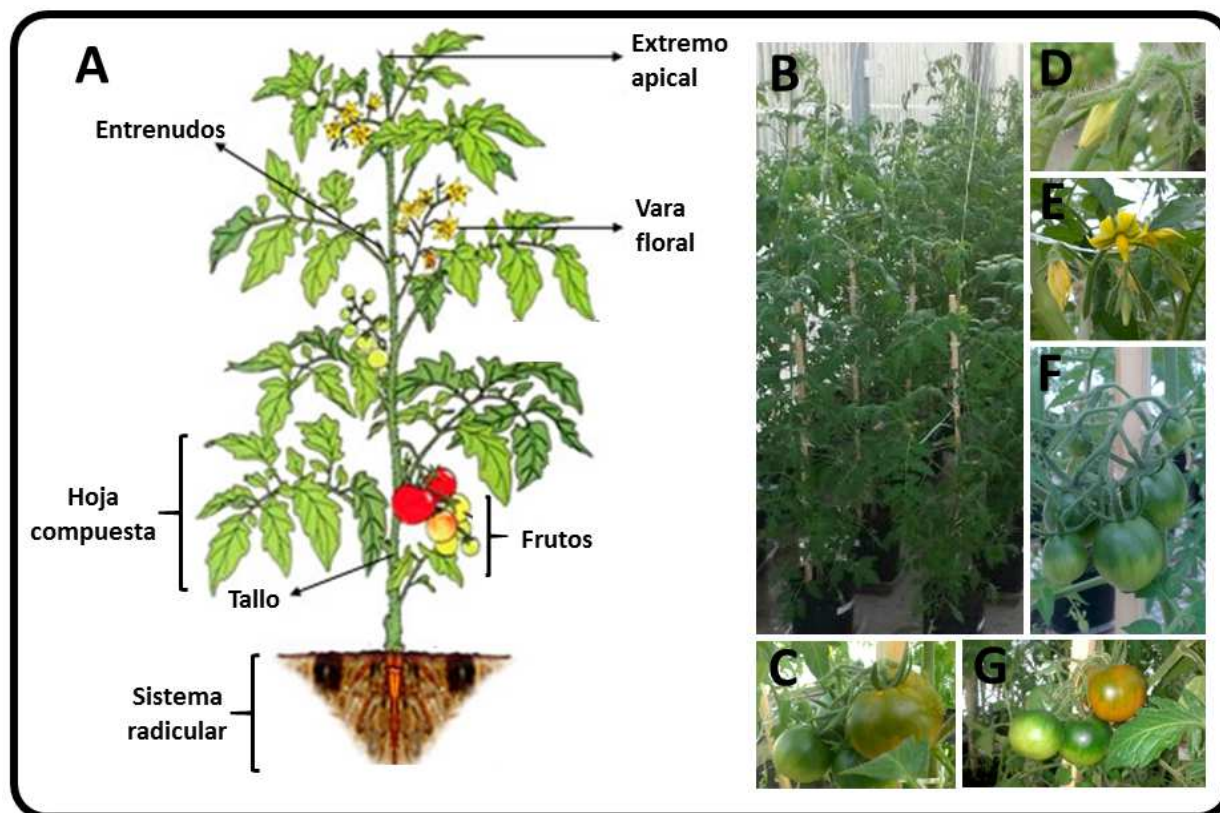
### **1.1.2. Taxonomía y morfología**

El tomate pertenece a la familia *Solanaceae* y la especie se denomina *Lycopersicon esculentum* Mill. La planta de tomate es perenne de porte arbustivo (Figura 1.1), y se la cultiva tradicionalmente como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

El tomate posee un **sistema radicular** con una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias y raíces adventicias. Posee un **tallo principal** de 2-4 cm de grosor que consta de epidermis, corteza o córtex, cilindro vascular y tejido medular. Sus **hojas** son compuestas, con 7 a 9 folíolos peciolados, con borde dentado y recubiertos de pelos glandulares. Las hojas se disponen de forma alternativa sobre el tallo. La **flor** es regular e hipógina (ovario súpero, es decir el ovario se encuentra sobre el receptáculo y sobre el punto de inserción de las otras partes florales como lo son los sépalos, pétalos y los estambres), y consta de 5 o más sépalos, e igual número de pétalos de color amarillo y dispuestos de forma helicoidal. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (vara floral), generalmente en número de 3 a 10. La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal.



El **fruto** es una baya bi o plurilocular carnosa que puede ser de color rojo o amarillo y puede variar en tamaño desde 1,5-10 cm de diámetro. Está compuesto de una epidermis, un grueso pericarpio, y tejido placentario que rodea a las semillas (Prance y Nesbitt, 2006) (Figura 1.1).



**Figura 1.1. Representación esquemática de una planta de tomate.**

**A)-** Esquema donde se indican algunas de las partes más importantes de una planta de tomate de crecimiento indeterminado. **B-G)-** Fotografías de las diferentes partes de una planta de tomate (*Solanum lycopersicum* cv Ailsa Craig).

### 1.1.3. Importancia del cultivo de tomate

Si bien el tomate botánicamente es un fruto, el mismo se incluye entre los vegetales denominados hortalizas. Dentro de las hortalizas se agrupan las plantas que son cultivadas generalmente en huertas que se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o mínimamente procesada. El tomate es la segunda hortaliza más

importante del mundo en cuanto al volumen producido, después de la papa, y la de mayor valor económico. Su relevancia no sólo se refiere a la producción sino también a los valores comercializados internacionalmente. Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. El incremento anual de la producción en los últimos años se debe principalmente al aumento en el rendimiento y en menor proporción al aumento de la superficie cultivada. El tomate en fresco se consume principalmente en ensaladas o cocido. A nivel industrial el tomate se comercializa de diversas maneras tales como: tomate al natural pelado, jugos, purés, pastas, concentrado, salsas de tomate, tomate confitado, tomate en polvo, encurtido (conserva), entre otros.

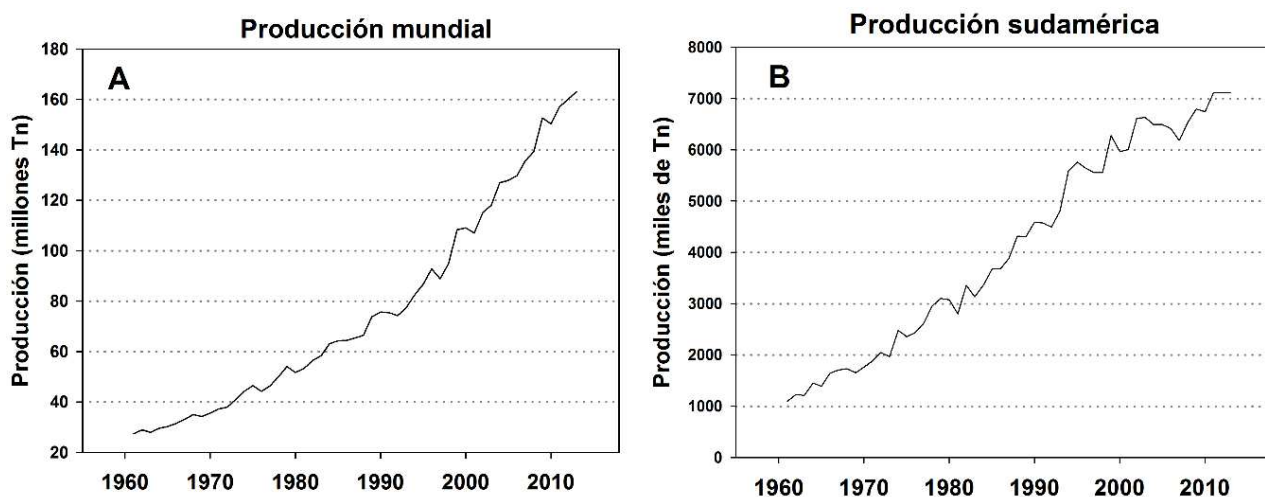
#### *1.1.3.1. El tomate en el mundo*

De acuerdo a los datos suministrados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2013), en los últimos 10 años la evolución productiva mundial fue positiva, incrementándose en un 44%. El aumento de la producción mundial de tomates se debe principalmente a aspectos tecnológicos, y en menor medida (15%) al incremento de la superficie total cultivada (Viteri y col., 2013).

La superficie implantada con tomate a nivel mundial disminuyó drásticamente entre 2006 y 2009. Sin embargo, el volumen producido sigue una curva ascendente debido a la incorporación de tecnologías en el manejo del cultivo (Figura 1.2-A).

China lidera el crecimiento de la producción mundial de tomate. Su alto peso demográfico dentro del planeta y el incremento de sus principales indicadores económicos, modifica continuamente el panorama productivo en el mundo (Viteri y col., 2013). Para el caso del tomate, China incrementó su participación mundial en la

producción entre 2000-2011 del 20% al 30% (FAO, 2013). En el caso de nuestra región, si bien Centroamérica mantiene su producción y Sudamérica registra un incremento del 20% en los últimos 20 años (Figura 1.2-B), esto no ha alcanzado para mantener el porcentaje de tomate producido en nuestra región en relación a la producción global (Viteri y col., 2013).



**Figura 1.2. Producción de tomate en el mundo y Sudamérica.**

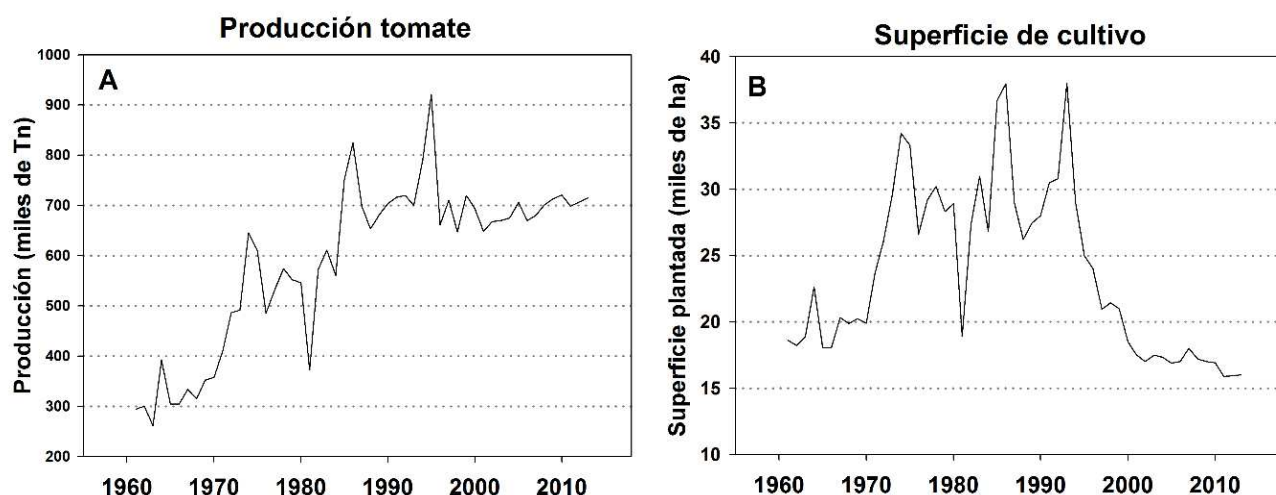
**A)-** Producción mundial (millones de toneladas); **B)-** Producción Sudamericana (miles de toneladas), en el período de 1961-2013. Fuente: FAO-STAT (<http://faostat3.fao.org>).

### 1.1.3.2. El tomate en la Argentina

De los más de 19 tipos de hortalizas detallados en el último censo nacional (donde se incluyen las hortalizas pesadas: cebolla, zanahoria y ajo) (INDEC, 2003, Censo Agropecuario), el tomate ocupa el quinto lugar dentro de la superficie dedicada para el cultivo a campo (14.389 ha), y el primero bajo cubierta (1.185 ha). Durante los últimos años, la evolución de la producción de tomate en Argentina se mantuvo aproximadamente constante, mientras que el área de cultivo ha disminuido considerablemente (Figura 1.3). En los 1990s, la superficie cultivada con tomate era de 24.000-30.000 ha aproximadamente, mientras que en estos últimos años el promedio no superó las 17.000 ha. Este incremento del rendimiento productivo por hectárea

guarda relación con la tendencia mundial y con el progresivo aumento del cultivo bajo cubierta (Viteri y col, 2013).

En Argentina se diferencia la producción de tomate en función de las condiciones agroecológicas. La zona de Cuyo (Mendoza y San Juan) se destaca por las producciones al aire libre, particularmente de tomate perita, cuyo destino final es la industria. Históricamente, las provincias del norte (Salta, Jujuy, Corrientes) son proveedoras de tomate en invierno. Actualmente, la incorporación del cultivo en invernáculo ha permitido una oferta de este fruto sostenida a lo largo del año. De allí que las provincias de Corrientes y Buenos Aires se han convertido en las principales responsables de la oferta de tomate fresco en el período invernal.



**Figura 1.3. Producción y superficie de cultivo de tomate en Argentina.**

**A)-** Crecimiento de la producción (miles de toneladas); **B)-** Variación en la superficie de cultivo (miles de hectáreas), de tomate en la Argentina en el período de 1961-2013. Fuente: FAO-STAT (<http://faostat3.fao.org>).

#### 1.1.3.2.1. El tomate en la ciudad de La Plata

La zona hortícola de la ciudad de La Plata se asocia a la fundación de la ciudad (1882). Siguiendo las pautas de planificación urbana, los lotes lindantes al casco urbano

se destinaban a la producción de frutas y hortalizas, mientras que los más distantes se destinaban para chacras (ganado menor, cereales, etc.).

Debido a las condiciones climáticas y la tecnología utilizada, hasta 1980 la producción en este cinturón platense se concentraba en el período estival. Su competitividad estaba basada en la falta de oferta de otras zonas productivas o la incapacidad de éstas para transportar sus producciones hacia los principales centros de consumo (Buenos Aires). En los 1990s este sector productivo entró en crisis. La sobreoferta hortícola generó bajos precios, llevando a los productores de la zona a innovar en tecnologías productivas, como el cultivo bajo cubierta, que les permitiera suministrar los productos en períodos de escasez.

La superficie bajo cubierta en la zona de La Plata, que en el último censo era de 1.389,9 ha (Censo Hortiflorícola de la Provincia de Buenos Aires 2005), habría superado las 2.500 ha para hortalizas y flores en 2009 (Viteri y col., 2013). El volumen producido bajo invernáculo permite no sólo abastecer a un mercado cercano en crecimiento, sino que también pone en franco retroceso a sus competidores tradicionales (Viteri y col., 2013).

#### ***1.1.4. Problemas poscosecha en la producción del tomate fresco***

En Argentina, la producción frutihortícola es una actividad intensiva que requiere de una gran cantidad de mano de obra, y ha sido identificada como un sector estratégico con alto impacto regional con posibilidades de expansión (Idígoras, 2014). Un aspecto clave para optimizar el aprovechamiento de la producción generada es mejorar los aspectos ligados a la conservación poscosecha (período de almacenamiento del producto previo al consumo).

Las pérdidas cualitativas y cuantitativas durante la poscosecha de frutas y hortalizas varían ampliamente entre diferentes productos, zonas de producción y épocas del año, pero se estima que un tercio de la producción mundial de frutas y vegetales no llega a ser consumido por el hombre (Kader, 2005). Estas pérdidas son cuantiosas en todo el mundo, pero en el caso particular de países en desarrollo, como lo es la Argentina, las pérdidas poscosecha de productos frescos pueden alcanzar el 50% de la producción. Por ello, a fines de aumentar la disponibilidad de un fruto o vegetal determinado es considerablemente más eficiente y económico reducir las pérdidas que se producen durante la poscosecha que tratar de incrementar su producción (Kader, 2005). Esto puede aumentar significativamente la disponibilidad de alimentos para una población mundial creciente, a la vez que disminuir el área de cultivo y conservar recursos naturales. Ahora bien, el diseño de métodos y estrategias de conservación poscosecha requiere de un conocimiento detallado de los procesos fisiológicos que ocurren durante la maduración y senescencia de los frutos. El tomate no es la excepción a esta problemática en crecimiento.

Uno de los principales factores determinantes de la calidad de un fruto es su *firmeza*. El ablandamiento prematuro o excesivo provoca la pérdida de los caracteres organolépticos óptimos, aumenta la susceptibilidad al ataque de patógenos y a los daños mecánicos y por lo tanto limita su vida poscosecha (Li y col., 2010). La firmeza de un fruto está principalmente determinada por la rigidez mecánica provista por la pared celular (Payasi y col., 2009)., la cual durante la maduración sufre una disminución del contenido, solubilización y depolimerización de distintos componentes por la acción combinada de diferentes proteínas y enzimas.

En las secciones venideras se profundizará sobre el deterioro poscosecha del fruto de tomate y la pérdida de firmeza del fruto de tomate (ablandamiento) como actor de gran relevancia en este proceso.

## **1.2. LA CÉLULA VEGETAL Y SU PARED CELULAR PRIMARIA**

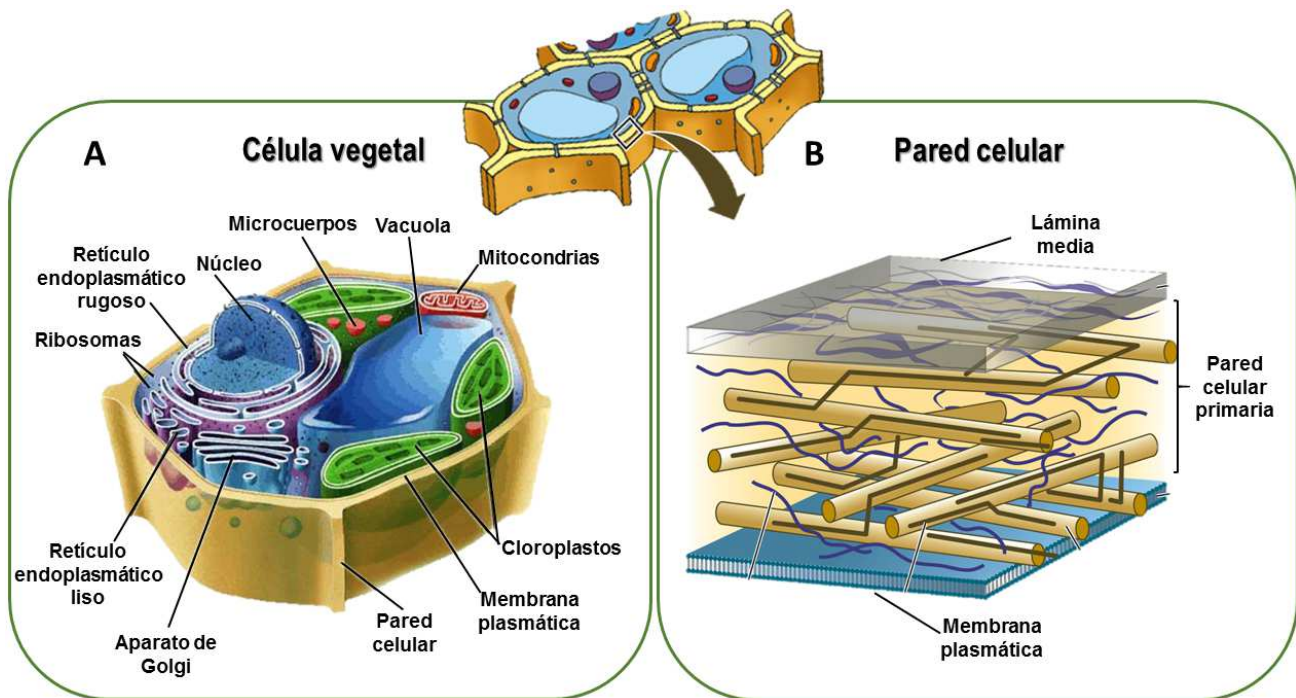
La célula es la unidad básica y fundamental de la vida, la cual puede constituir por sí sola un individuo o formar parte de un organismo pluricelular. Las células son excepcionalmente dinámicas, todas sus actividades se realizan en un medio acuoso e implican un desplazamiento de solutos dentro de la misma célula, entre células, y entre la célula y su medio externo.

La célula vegetal comparte similitud estructural con las típicas células eucariotas, aunque también poseen estructuras especializadas como: pared celular, vacuola central, plasmodesmos y cloroplastos (Figura 1.4-A). Los diferentes tipos de células vegetales pueden distinguirse por la forma, espesor y constitución de su pared celular, como también por su contenido (Taiz y Zeiger, 2006).

Los **cloroplastos** son la organela donde se encuentra la maquinaria fotoquímica para llevar a cabo la fotosíntesis. Los mismos se encuentran dentro del grupo de organelas llamadas plástidos que poseen una doble membrana. Los cloroplastos contienen además un tercer sistema de membranas llamadas tilacoides que agrupadas forman las granas, donde las proteínas y pigmentos (clorofilas y carotenoides) son los encargados de llevar a cabo la fotosíntesis. El fluido que rodea a los tilacoides constituye el estroma.



Las células vegetales están interconectadas entre sí, por ende, sus citoplasmas forman un continuo (simplasto) a través del cual se transfieren agua y solutos, entre otros. Esta conexión se realiza a través de los **plasmodesmos**, que son extensiones tubulares de la membrana plasmática que atraviesan la pared celular (Taiz y Zeiger, 2006).



**Figura 1.4. Esquema general de una célula vegetal adulta.**

**A-** Célula vegetal con sus diferentes componentes; **B-** Esquema básico de una pared celular vegetal primaria. (Adaptado de [www.plantcell.us](http://www.plantcell.us); [www.biology-forums.com](http://www.biology-forums.com)).

Aproximadamente el 80% a 90% del volumen total de una célula vegetal adulta es ocupado por una gran **vacuola central**, espacio delimitado por una membrana simple o **tonoplasto**. La vacuola almacena compuestos, ayuda al crecimiento de la célula y tiene un rol relevante en la estructura celular vegetal. La presión ejercida por el agua de la vacuola sobre el tonoplasto y la pared celular se denomina presión de turgencia y contribuye a mantener la rigidez de la célula, por lo que el citoplasma y el



núcleo de una célula vegetal adulta se presentan adosados a las paredes celulares (Taiz y Zeiger, 2006).

Otra estructura muy relevante y distintiva de una célula vegetal es su ***pared celular vegetal primaria*** (Figura 1.4-B). Esta rígida pared rodea a la membrana plasmática y desempeña una gran variedad de funciones que van desde la protección de la célula hasta la regulación del ciclo de vida del organismo vegetal (Taiz y Zeiger, 2006).

### ***1.2.1. La pared celular vegetal primaria***

La pared celular vegetal primaria es una estructura compleja, altamente organizada y dinámica constituida por una matriz de polisacáridos de diversa composición química, proteínas estructurales y funcionales, y compuestos fenólicos (Carpita y McCann, 2000). Dicha estructura rodea la membrana plasmática, otorga soporte y rigidez mecánica a los tejidos vegetales, constituye una barrera de defensa frente al ataque de patógenos, además de mediar la comunicación con simbiontes y células vecinas (Carpita y Gibeaut, 1993; John y col., 1997; Dhugga, 2001).

En las células vegetales en crecimiento, la pared celular primaria debe ser lo suficientemente fuerte como para resistir la fuerza mecánica generada por la alta presión de turgencia de las células y, aun así, ser flexible para permitir el aumento del volumen celular durante el crecimiento. A medida que las células envejecen, sus paredes se vuelven inextensibles y resistentes a la degradación.

En algunos tipos de tejidos vegetales el envejecimiento de las células conlleva a una especialización en su función. Dependiendo de ello, una vez que se ha detenido el crecimiento celular se forma una pared más rígida no deformable con alta proporción de celulosa, además de lignina o suberina llamada ***pared celular vegetal secundaria***.

Otros tipos y tejidos celulares conservan la capacidad de desensamblar la pared; ejemplo de esto es el ablandamiento de un tejido firme, como ocurre durante el ablandamiento de frutos carnosos como el tomate (*Solanum Lycopersicum*) (Cosgrove, 1997).

### **1.2.2. Componentes de la pared celular vegetal**

#### *1.2.2.1. Polisacáridos*

La composición de la pared celular vegetal primaria varía en los diferentes tipos celulares y en los diferentes grupos taxonómicos. El componente estructural principal es la **celulosa** (entre un 20-40% del peso seco de las paredes vegetales), siendo el compuesto orgánico más abundante en la tierra. Se encuentra formado por monómeros de D-glucosa unidos de manera lineal a través de enlaces ( $\beta$  1-4). Miles de moléculas de D-glucosa dispuestas de manera lineal se disponen paralelas entre sí y se unen por puentes de hidrógeno formando microfibrillas de 10 a 25 nm de espesor (Emons, 1988; McCann y col., 1990). Estas cadenas de glucanos interactúan estrechamente a través de enlaces de hidrógeno, excluyendo el agua para producir áreas de cristalinidad. Esto confiere una considerable resistencia a la tracción. La estructura cristalina de origen natural se conoce como celulosa I. Sin embargo, pueden producirse otras varias formas (II, III, y IV) como resultado de tratamientos térmicos o mecánicos (Waldron y col., 2003).

Las microfibrillas de celulosa se unen fuertemente por enlace de hidrógeno a carbohidratos no fibrilares a los que se denomina genéricamente **hemicelulosas** (aproximadamente 30% del peso seco de las paredes vegetales). Estas constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos flexibles y fuertemente unidos a través de enlaces

punto de hidrogeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa (Varner y Lin, 1989). Las hemicelulosas pueden unirse a dos microfibrillas de celulosas adyacentes de manera tal de formar una red (Hayashi, 1989).

Los componentes mayoritarios de las hemicelulosas son: xiloglucanos y glucuronarabinoxilanos.

Los xiloglucanos son las hemicelulosas predominantes en los frutos de las plantas dicotiledóneas (Waldrom y col., 2003). Son cadenas lineales de (1-4)- $\beta$ -D-glucosa, al igual que las celulosas, pero sustituidas de forma regular por cadenas cortas de  $\alpha$ -D-xilosas,  $\alpha$ -L-fucosa y  $\beta$ -D-galactosa unidas de manera regular al O-6 de la glucosa (Fry, 1989).

Los glucuronarabinoxilanos están conformados por una cadena central de xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4), y residuos de arabinosa y ácido glucurónico como sustituyentes (Waldrom y col., 2003).

En una proporción mucho menor se encuentran presentes otras hemicelulosas que incluyen: xilanos (formados por un esqueleto de D-xilosa en uniones  $\beta$ -(1-4), el cual puede contener ramificaciones de arabinosa u otros azúcares), glucomananos y galactomananos (Fisher y Bennett, 1991).

Otros componentes importantes de las paredes celulares son las **pectinas** (aproximadamente 35% del peso seco de las paredes vegetales), que constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que contienen cantidades significativas de ramnosa, arabinosa y galactosa (Waldrom y col., 2003). Las pectinas son los polisacáridos más solubles de la pared celular, y pueden ser extraídas con agua caliente, agentes quelantes o ácidos diluidos (Fisher y Bennett, 1991). Las pectinas más importantes de la pared celular vegetal son:

- ✓ Homogalacturonanos;
- ✓ Ramnogalacturonanos I (RG I);
- ✓ Ramnogalacturonanos II (RG II).

#### *1.2.2.2. Proteínas estructurales y proteínas solubles*

La pared celular contiene una amplia gama de proteínas, que se pueden clasificar en dos grupos: proteínas estructurales y proteínas solubles (aproximadamente 5% del peso seco de las paredes vegetales).

Las **proteínas estructurales** son ricas en uno o dos aminoácidos, tienen dominios con secuencias repetidas y están glicosiladas en mayor o menor grado. Se ha propuesto que la mayoría de las proteínas estructurales de la pared celular vegetal tienen una estructura fibrilar y que están unidas entre sí o con distintos carbohidratos mediante enlaces covalentes (Showalter, 1993). Se consideran proteínas estructurales de la pared celular vegetal: extensinas o proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en prolina, proteínas ricas en glicina y arabinogalactanos (Waldrom y col., 2003).

Incluidas en la red de polisacáridos y proteínas estructurales, se encuentran diversas **proteínas solubles**, algunas de las cuales son enzimas relacionadas con la producción de nutrientes como la glucosidasa, enzimas relacionadas con el metabolismo de la pared, proteínas relacionadas con la defensa, y proteínas de transporte, entre otras (Showalter, 1993; Fry 1986, Wallace y Fry 1982).

Las proteínas relacionadas con el metabolismo de la pared celular constituyen generalmente familias de isoformas que presentan patrones de expresión diferentes en distintos tejidos u órganos, y que pueden variar en distintos estadios de desarrollo. A

continuación, se describen brevemente las principales familias de proteínas relacionadas al metabolismo de la pared celular:

a) *Endo-(1-4)- $\beta$ -D-glucanasas (EGasas)*: estas enzimas hidrolizan los enlaces internos de los residuos de cadenas de glucanos unidos por enlaces  $\beta$ -D (1-4), adyacentes a residuos no sustituidos (Brummell y Harpster, 2001). No son capaces de hidrolizar celulosa cristalina.

b) *Xiloglucano endotransglicosilasas (XETs)*: catalizan la hidrólisis de los enlaces internos de los esqueletos  $\beta$ -D (1-4)-glucano del xiloglucano (Brummell y Harpster, 2001).

c) *Endo-xilanasas (EXnasas)*: que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -(1-4) internos del esqueleto de los xilanos, generando xilo-oligosacáridos. (Cleemput y col., 1997).

d)  *$\beta$ -D-xilosidasas ( $\beta$ -Xils)*: catalizan la liberación de xilosas a partir de los extremos no reductores de los xilo-oligosacáridos generados por las endo-xilanasas (Cleemput y col., 1997).

e) *Endo-(1-4)- $\beta$ -mananasas ( $\beta$ -Masas)*: catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4) entre dos manosas presentes en glucomananos, galactoglucomananos y galactomananos.

f)  *$\beta$ -D-galactosidasas ( $\beta$ -Gal)*: enzimas del tipo exo  $\beta$ -galactosidasas, ya que las del tipo endo no han sido detectadas en plantas superiores. Catalizan la remoción del residuo  $\beta$ -D-galactosilo del extremo no reductor de las cadenas laterales de los ramnogalacturanos I, donde se encuentra la mayoría de los residuos de galactosa de la pared celular (Brummell y Harpster, 2001).

g)  *$\alpha$ -L-arabinofuranosidasas ( $\alpha$ -Aras)*: son enzimas que actúan sobre diferentes fracciones pécticas y hemicelulósicas liberando residuos de arabinosa a partir del extremo no reductor de arabinanos (Tateishi y col., 1996).

h) *Poligalacturonasas (PGs)*: estas enzimas catalizan la ruptura hidrolítica de las uniones  $\alpha$ -(1-4) de los residuos de ácido D-galacturónico que forman parte de los homogalacturonanos; pueden ser del tipo endo o exo (Brummell y Harpster, 2001).

i) *Pectin metil esterasas (PMEs)*: son las responsables de de-esterificar los homogalacturonanos, los cuales son secretados a la pared con un alto grado de metil-esterificación (Fisher y Bennett, 1991).

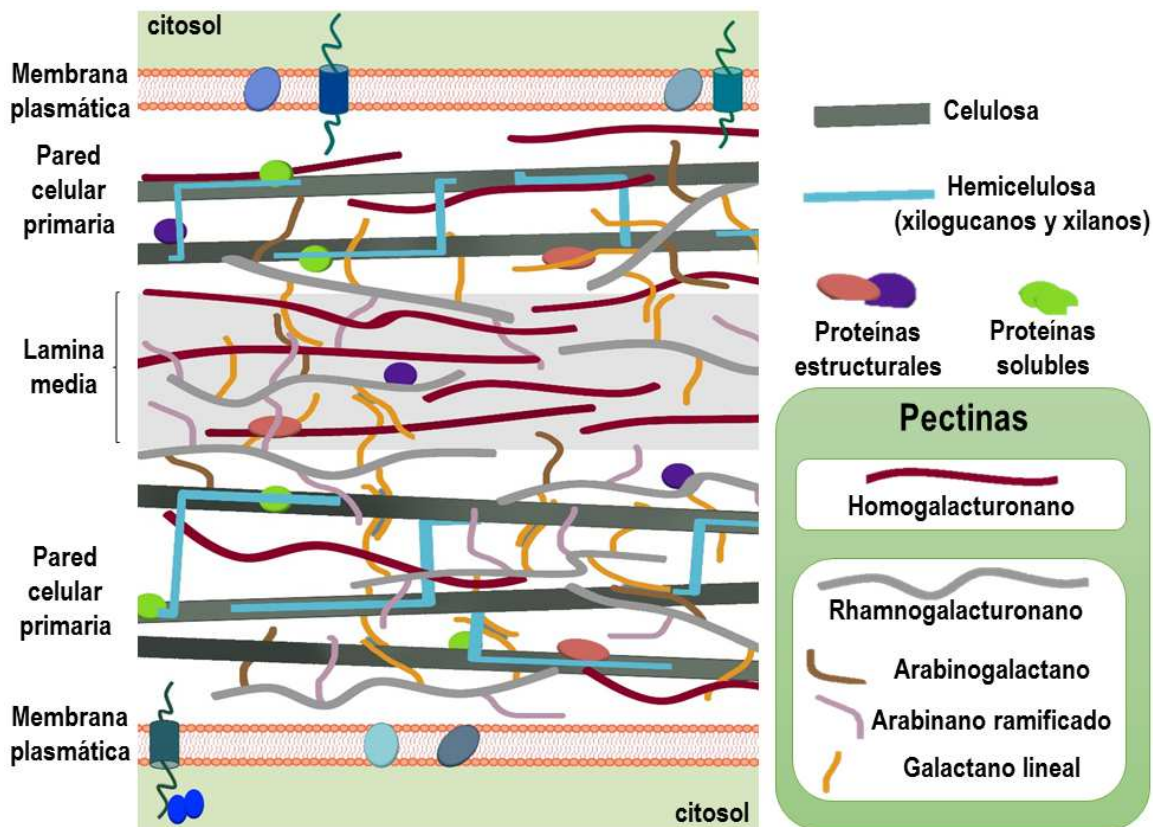
j) *Pectato liasa (PEL)*: cataliza la ruptura mediante un mecanismo de  $\beta$ -eliminación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de las pectinas no-esterificadas.

k) *Expansinas*: fueron aisladas como mediadoras del “crecimiento ácido” y hasta el momento no se ha logrado detectar que las mismas posean actividad hidrolítica enzimática. Sin embargo, las expansinas cumplirían un rol fundamental en una serie de procesos que involucran el desensamblaje de la pared celular, tales como el crecimiento de la raíz y el tallo, la abscisión de hojas, la germinación de semillas y la maduración de frutos (Cosgrove, 1997; Cho y Cosgrove, 2000).

### **1.2.3. Modelo de pared celular vegetal primaria**

El modelo ampliamente aceptado para las plantas dicotiledóneas postula que las microfibrillas de celulosa están cubiertas y entrecruzadas con las hemicelulosas de la matriz, principalmente xiloglucano. El esqueleto de glucano del xiloglucano se une firmemente a la celulosa mediante enlaces de hidrógeno y las moléculas de xiloglucano pueden extenderse entre microfibrillas adyacentes, manteniéndolas unidas. Los

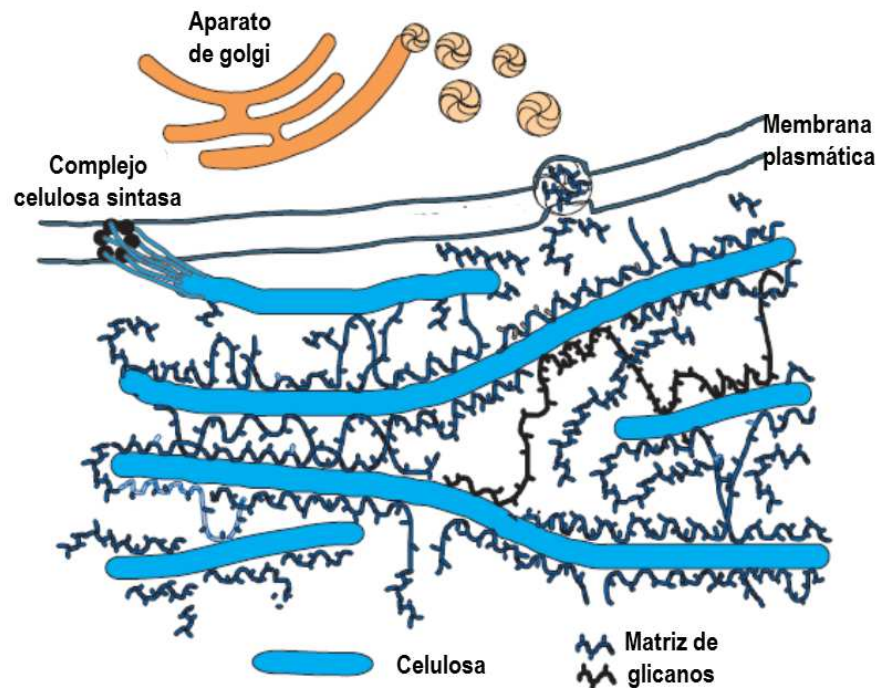
glucomananos y glucoarabinosilanos están presentes en cantidades menos abundantes y también entrecruzan a las microfibrillas mediante enlaces de hidrógeno, aunque más débilmente que el xiloglucano. Los espacios en la red de celulosa/hemicelulosa son ocupados por las pectinas altamente hidratadas, las cuales forman a su vez una red que se mantiene unida por enlaces éster entre las moléculas de pectina y por uniones iónicas a través del ion  $\text{Ca}^{2+}$  entre los grupos carboxilato presentes en los homogalacturonanos demetilados. Adicionalmente, las redes de celulosa/hemicelulosa y de pectinas podrían mantenerse unidas por enlaces covalentes entre algunas moléculas de xiloglucano y las pectinas. Finalmente, las proteínas estructurales estarían formando una red adicional (Thompson y Fry, 2000; Brummell y Harpster, 2001).



**Figura 1.5. Esquema de la estructura característica de la pared celular.**

Modelo esquemático de la estructura de la pared celular primaria de una planta de dicotiledónea basada en el modelo de redes conectadas. La pared celular primaria está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosas, pectinas y proteínas estructurales. Adaptado de Blanco-Ulate (2016).

La lámina media es una estructura que constituye la interfase entre las paredes primarias de células vecinas, manteniéndolas unidas y comunicadas. En la lámina media predominan pectinas entrecruzadas, que se localizan entre dos células contiguas y constituyen la matriz donde está embebida la red de celulosa/hemicelulosa de la pared primaria (Carpita y Gibeaut, 1993).



**Figura 1.6. Representación esquemática de la biogénesis de la pared celular primaria.**

Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas por grandes complejos de celulosa sintasa en la membrana plasmática. La celulosa recién segregada se asocia entonces con la matriz de glicanos (hemicelulosas y pectinas) que se sintetizan en el aparato de Golgi y se suministran a la pared mediante vesículas secretoras. Adaptado de Cosgrove (2000).

La pared celular vegetal se constituye durante la división celular, a partir de vesículas que provienen del aparato de Golgi. Estas vesículas, llenas de los componentes de la pared celular, se localizan en el fragmoplasto, que es un arreglo del citoesqueleto propio de las células en división. En el fragmoplasto se fusionan las vesículas del aparato de Golgi y crecen desde el interior de la célula en división, hasta



ponerse en contacto con las paredes laterales. Una vez formada, la pared celular crece por deposición de capas sucesivas de celulosa. En cada capa, la orientación de las microfibrillas de celulosa está guiada por el citoesqueleto, más exactamente por los microtúbulos corticales, los cuales alinean al complejo responsable de la síntesis de celulosa conformado por la celulosa sintasa (Carpita y McCann, 2000) (Figura 1.6).

### **1.3. EXPANSINAS**

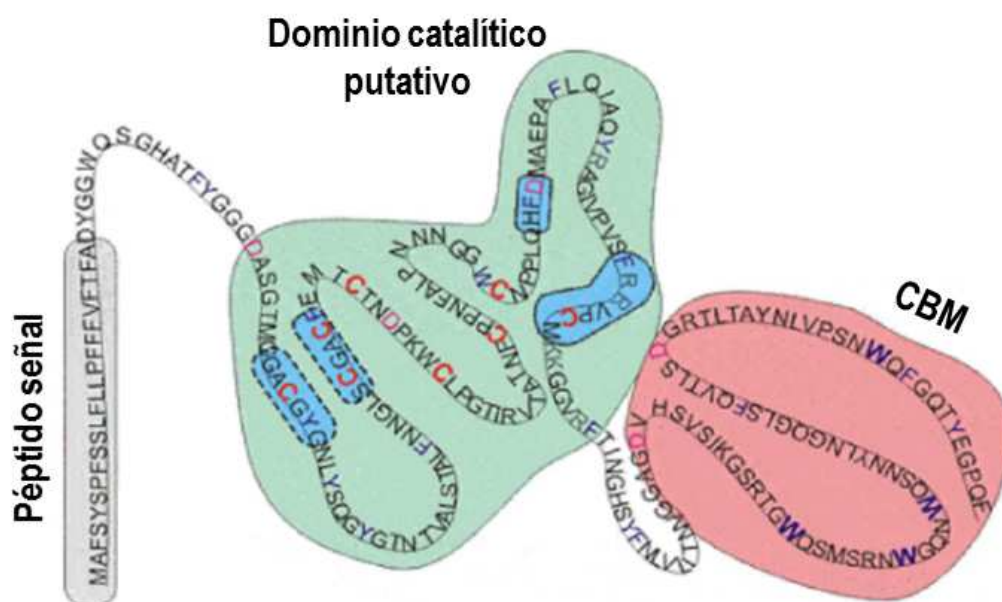
#### **1.3.1. Aspectos generales**

Las expansinas son proteínas pequeñas constituidas por 250-275 aminoácidos que poseen una estructura característica que incluye un péptido tránsito y dos dominios (Figura 1.6). El péptido tránsito se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, posee de 22 a 25 aminoácidos y es el encargado de dirigir la proteína a la ruta secretora, que la termina localizando en la pared celular. Además, las expansinas poseen un dominio catalítico putativo en el extremo N-terminal, el cual muestra una similitud de secuencia con una endo-1,4- $\beta$ -glucanasa de *Trichoderma*, [eg15] (Saloheimo y col., 1994), la cual ha sido clasificada como miembro de la familia-45 de las glicosilhidrolasas (Henrissat y col., 1998); y un dominio en el extremo C-terminal con alta identidad de secuencia con el grupo II de alérgenos del polen de gramíneas (Sampedro y Cosgrove, 2005). En un principio, este módulo no tenía una función biológica conocida, aunque más tarde se demostró que se comportaría como un módulo de unión a carbohidratos (CBM) (Figura 1.7).

En base a análisis filogenéticos, se reconocen cuatro familias de expansinas en plantas:  $\alpha$ -expansinas (EXPA),  $\beta$ -expansinas (EXPB), expansina-like A (EXLA) y

expansina-like B (EXLB) (Kende y col., 2004), siendo las dos primeras familias las más abundantes (Sampedro y Cosgrove, 2005).

El genoma de tomate incluye 38 genes de expansinas. Los análisis filogenéticos permitieron identificar que 25 de ellas son  $\alpha$ -expansinas (EXPA), 8  $\beta$ -expansinas (EXPB), 1 Expansina-like  $\alpha$  (EXLA) y 4 Expansina-like  $\beta$  (EXLB) (Lu y col., 2015).



**Figura 1.7. Esquema de la estructura característica de las expansinas.**

El péptido señal (en gris) en el extremo N-terminal dirige al polipéptido a la ruta secretora. La proteína madura consta de dos dominios. El dominio N-terminal (verde) sería el dominio activo de la proteína con identidad de secuencia similar a una endoglucanasa. En el extremo C-terminal (rosa) se encontraría el dominio de anclaje de la proteína o Módulo de Unión a Carbohidratos (CBM). Adaptado de: <http://www.personal.psu.edu/fsl/ExpCentral/index.htm>

Las expansinas pertenecientes a diferentes familias comparten solamente un 20-40% de identidad de secuencia entre sí. El grado de conservación es mayor en el dominio N-terminal, que sería el encargado de la actividad biológica de las expansinas (Sampedro y Cosgrove, 2005).

Las  $\alpha$ -expansinas y las  $\beta$ -expansinas han sido ampliamente caracterizadas y se ha demostrado su capacidad para extender paredes celulares (McQueen-Mason y col., 1992; Cosgrove, 1999). En cambio, de las familias EXLA y EXLB sólo se conocen sus secuencias génicas. La comparación de la secuencia de aminoácidos de proteínas correspondientes a la familia de las  $\alpha$ -expansinas indica un porcentaje de identidad entre el 60 y 90%. Por su parte, las  $\beta$ -expansinas se caracterizan por tener una mayor diversidad, presentando un grado de identidad entre distintos miembros de la familia que varía entre 28 y 76% (Cosgrove, 1998). La conformación tridimensional de las expansinas está más conservada que su secuencia primaria; por ejemplo, la similitud topológica entre las  $\alpha$  y  $\beta$ -expansinas es de un 75% (Cosgrove, 1997).

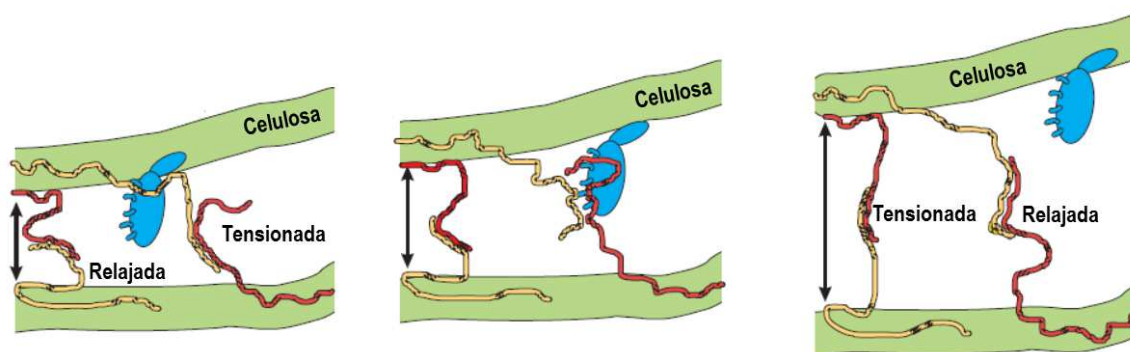
Aunque las expansinas poseen un dominio con identidad de secuencia similar al de una endoglucanasa, los intentos por detectar esta actividad enzimática experimentalmente han sido infructuosos (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994; 1995). Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -expansinas, pese a disponer de un dominio HFD (Histidina-Fenilalanina-Aspartato) en el dominio 1 (ausente en EXLA y EXLB), carecen del residuo de ácido aspártico que, se cree, es necesario para realizar la acción de las endoglucanasas, lo cual podría explicar la ausencia de esta actividad enzimática en los ensayos “*in vitro*” (Yennawar y col., 2006). Asimismo, para las  $\alpha$ -expansinas tampoco se logró detectar actividad pectinasa (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995) o transglicosilasa (McQueen-Mason y col., 1993). Aun careciendo de actividad hidrolítica, se demostró que estas proteínas poseían la capacidad de relajar la tensión en la pared celular y que, además, eran capaces de unirse a la interfase entre la celulosa y los polímeros de la matriz de la pared celular (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995).

Kerff y col. (2008) resolvieron la estructura cristalográfica de una expansina de *Bacillus subtilis* (EXLX1) y demostraron que estas proteínas poseen dos dominios, D1 y D2. El dominio D2 posee un plegamiento similar al encontrado en los alérgenos del polen de gramíneas, que a su vez poseen características estructurales similares a un CBM. Los autores también analizaron la capacidad de unión de esta expansina microbiana a polímeros de la pared celular de plantas, y probaron que se unía a celulosa (Kerff y col., 2008). Posteriormente, mediante estudios de mutagénesis sitio-dirigida realizados sobre esta misma expansina (EXLX1), se determinó que la capacidad de unión a la celulosa está mediada por tres residuos aromáticos (dos triptófanos y una tirosina) presentes en el dominio D2, y que se encuentran ubicados en la superficie de la estructura tridimensional de la proteína completa. El reemplazo de estos tres residuos por alanina, no sólo impidió la unión a celulosa, sino que también eliminó la capacidad de las expansinas de extender paredes celulares aisladas y de debilitar filtros de papel conformados únicamente por celulosa. Esto demostró que la unión a través del CBM es clave para que estas proteínas lleven a cabo su acción (Georgelis y col., 2011; 2012).

### **1.3.2. Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción actualmente aceptado para explicar la actividad biológica de las  $\alpha$ -expansinas se bosqueja en la Figura 1.8. Se ha propuesto que las  $\alpha$ -expansinas actuarían interrumpiendo los enlaces no covalentes entre la celulosa y los polisacáridos de la matriz (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995; Cosgrove, 2000). El dominio C-terminal actuaría anclando a la expansina a la superficie de la celulosa, mientras que el dominio central interactuaría con las hemicelulosas en la superficie de

las microfibrillas o en la matriz (Cosgrove, 2000) (Figura 1.8). En este modelo se propone que las expansinas, al ser capaces de debilitar los enlaces puente de hidrógeno (enlaces no covalentes) que mantienen unidas las hemicelulosas a las fibrillas de celulosa, permitirían el acceso de diversas enzimas, tales como endoglucanasas (Nicol y col., 1998; Levy y Shoseyov., 2002) y transglicosilasas (Redgwell y Fry, 1993; Schröder y col., 2004), facilitando de este modo la hidrólisis de los componentes de la pared, incluidas las pectinas. Esto contribuiría, de modo indirecto, al debilitamiento y la extensión de la pared celular.



**Figura 1.8. Esquema del mecanismo de acción propuesto para las  $\alpha$ -expansinas.**

Este modelo propone que las expansinas, son capaces de debilitar los enlaces puente de hidrógeno que mantienen unidas las hemicelulosas a las fibrillas de celulosa, permitiendo el acceso de diversas enzimas. De esta manera se facilitaría la hidrólisis de los componentes de la pared, contribuyendo de modo indirecto al debilitamiento y la extensión celular. Extraído de Cosgrove (2000).

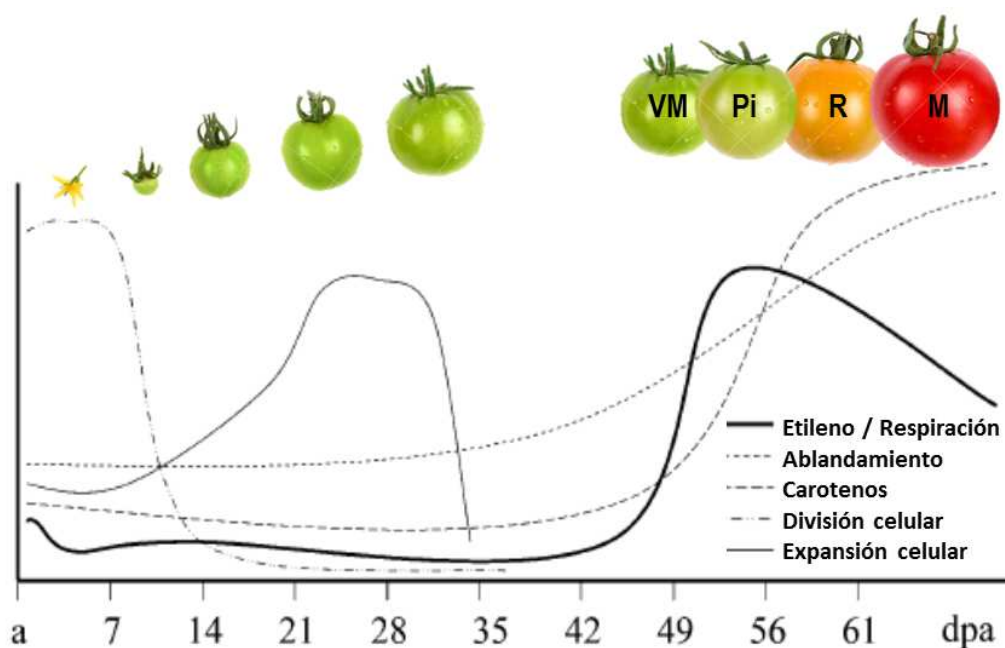
### 1.3.3. Función de las expansinas

Las expansinas se encuentran implicadas en distintos procesos que involucran el crecimiento y desarrollo de un gran número de especies de plantas. Entre estas funciones podemos mencionar la germinación de los granos de polen (Li y col., 2003), el crecimiento y desarrollo de raíces (Wu y col., 2001; Shin y col., 2005), el desarrollo floral (Gookin y col., 2003), la abscisión de órganos (Cho y Cosgrove, 2000), el metabolismo de la pared celular y su contribución al ablandamiento del fruto (Cosgrove, 2000; Payasi y col., 2009; Rose y col., 1997).

El ablandamiento excesivo es el principal factor que limita la vida poscosecha de las frutas (Brummell y Harpster, 2001). Se han aislado y caracterizado expansinas específicas de fruto en tomate (LeEXP1) (Rose y col., 1997), frutilla (FaEXP2) (Civello y col., 1999), damasco (Mbéguié-A-Mbéguié y col., 2002), banana (Trivedi y Nath 2004), manzana (Goulao y col., 2007), durazno (Hayama y col., 2003; Obenland y col., 2003), y melón (Nishiyama y col., 2007), entre otros; observándose la acumulación de sus transcriptos durante la maduración. Se sugirió que la acumulación de expansinas relacionadas con la maduración es un rasgo común de este proceso en la mayoría de los frutos pulposos (Civello y col., 1999; Rose y col., 2000).

#### **1.4. DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL FRUTO DE TOMATE**

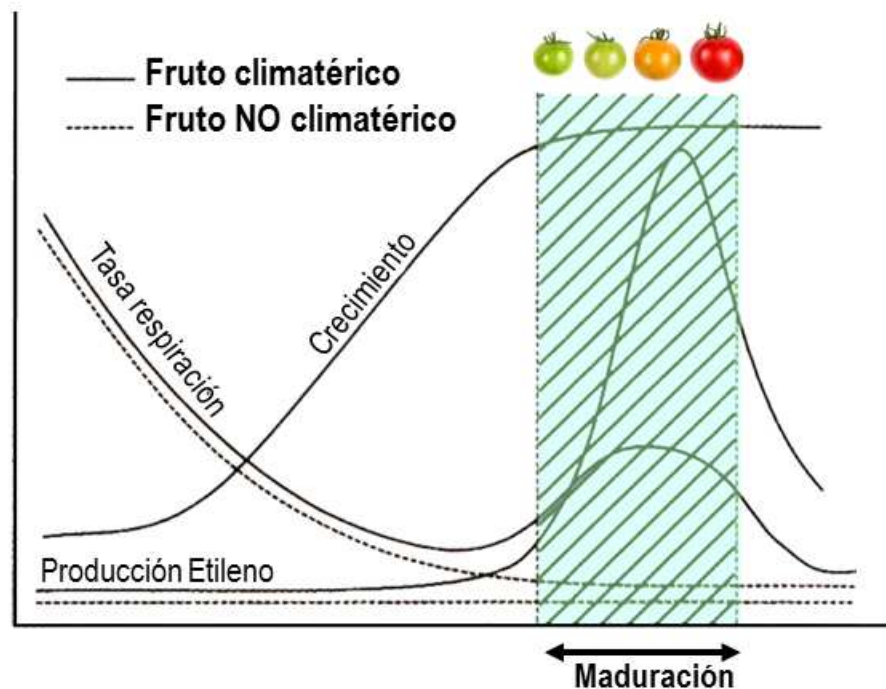
Luego que la flor del tomate es fecundada, el fruto comienza una serie de cambios que caracterizan la etapa de desarrollo del mismo. En los primeros días posantesis ocurre una elevada división celular en el fruto, que luego decae y da lugar al comienzo de la etapa de expansión celular. Con la finalización de esta etapa de expansión celular, el fruto alcanza la madurez fisiológica (el fruto contiene sus semillas completamente maduras y viables, y es capaz de continuar con su maduración fuera de la planta) (Figura 1.9.). Aquí comienza la etapa de maduración del fruto. La misma implica muchos procesos fisiológicos, incluyendo la producción de compuestos aromáticos y nutrientes, cambios de color y el ablandamiento del mismo (Giovannoni, 2004).



**Figura 1.9. Principales cambios del fruto de tomate durante el desarrollo y la maduración.**

Cambios relativos en la división celular, la expansión celular, la respiración, la síntesis de etileno, el ablandamiento de los frutos y la acumulación de carotenoides. El tiempo desde la antesis (a) hasta los estadios verde maduro (VM, fruto totalmente maduro expandido con la semilla madura), pintón (Pi, la primera acumulación visible de carotenoides), rojizo (R) y rojo maduro (M). Dpa, días después de la antesis. (Adaptado de: Giovannoni, 2004).

Los frutos se pueden clasificar como climatéricos o no climatéricos, de acuerdo a la relación existente entre la maduración del fruto, el incremento de la respiración y la producción de etileno (Figura 1.10). Los frutos climatéricos como el tomate, se caracterizan por un aumento de la respiración y un aumento concomitante en la síntesis del etileno al iniciarse la maduración. La síntesis de etileno es esencial para la maduración normal del fruto (Klee y Giovannoni, 2011).



**Figura 1.10. Representación esquemática de la producción de etileno de frutos climáticos y no climáticos.**

Cambios relativos en la producción de etileno y en la tasa de respiración para un fruto de tomate (fruto climático) y un fruto no climático.

Otro aspecto importante asociado con la maduración de tomate es la conversión de los cloroplastos en cromoplastos. Durante la transición de cloroplasto a cromoplasto, la capacidad fotosintética del cloroplasto se pierde a medida que las estructuras tilacoides comienzan a desmontarse y se degradan las clorofilas, mientras que paralelamente se inicia la síntesis de carotenoides. Dentro del cromoplasto se acumulan grandes cantidades de carotenoides, principalmente licopeno y  $\beta$ -caroteno, en forma de estructuras cristalinas. La acumulación de estos pigmentos proporciona una indicación visual de que el fruto es maduro y apto para el consumo (Figura 1.9.) (Klee y Giovannoni, 2011).

Por su parte, tal como se mencionó en la sección 1.1.4, el ablandamiento es un aspecto característico y central del progreso de la maduración en frutos pulposos. El ablandamiento se produce principalmente como resultado de las actividades de las



enzimas modificadoras de la pared celular de las plantas que desmontan las redes de polisacáridos allí presentes (Blanco-Ulate y col., 2016). La composición y el espesor de la cutícula del fruto y la disminución de la presión de turgencia celular durante la maduración también influyen en la textura del fruto (Brummell y Harpster 2001; Lara y col., 2014; Shakel y col., 1991). El ablandamiento compromete la integridad de las barreras físicas que tiene el fruto contra los patógenos y, por lo tanto, aumenta la susceptibilidad a las infecciones tanto en la planta como en el periodo poscosecha. Además, los frutos carnosos son más vulnerables a daños físicos, como moretones o grietas, que pueden proporcionar puntos de entrada para patógenos (Brummell y Harpster 2001).

Durante la maduración, la arquitectura de la pared celular y los polímeros que la componen se modifican progresivamente, variando la naturaleza o extensión de los mismos. La estructura de la pared celular se vuelve cada vez más hidratada a medida que cambia la cohesión del gel de pectina, y este es el principal factor que influye en la facilidad con que las células se pueden abrir o separar entre sí, lo que determina la textura del fruto (Jarvis, 1984). En tomate al comienzo de la maduración, se observa una reducción de la adhesión de célula a célula, provocada por la ruptura y disolución de la lámina media que las separa, la cual es rica en pectinas (Crookes y Grierson, 1983).

Asimismo, el pH del apoplasto (espacio continuo formado por las paredes celulares) disminuye durante la maduración de tomate y se observan cambios en la concentración de algunos iones. El  $K^+$ ,  $P$  y  $Cl^-$  aumentan durante la maduración mientras que el  $Ca^{+2}$  y el  $Na^+$  permanecen constantes (Almeida y Huber, 1999). La maduración también suele acompañarse de una reducción de la turgencia celular,

debido a concentraciones crecientes de solutos en el espacio de la pared celular y al aflojamiento de la pared (Shackel y col., 1991).

El análisis de los polisacáridos de la pared celular ha revelado que se producen grandes cambios tanto en pectinas como en los glucanos de la matriz durante la maduración de tomate (Brummell y Harpster, 2001). En este período las pectinas se vuelven cada vez más despolimerizadas y solubles (Brummell y Labavitch, 1997; Huber y O'Donoghue, 1993). La despolimerización de las pectinas y la pérdida de las cadenas laterales de galactosa y arabinosa del RG I (Gross, 1984, Gross y Sams, 1984), aumenta la porosidad de la pared, que al inicio de la maduración es en general baja lo cual limita el acceso de las hidrolasas a sus sustratos (Baron-Epel y col., 1988). Las pectinas son secretadas en forma metil-esterificadas al apoplasto; la des-esterificación de las pectinas se inicia en la lámina media en un fruto verde maduro y se extiende progresivamente por toda la pared durante la maduración de tomate (Roy y col., 1992).

La distribución de pesos moleculares de la fracción de glucanos unidos débilmente a la celulosa, constituida principalmente por glucomananos y xilanos, cambia muy poco durante la maduración, a diferencia de la correspondiente a los glucanos que se encuentran estrechamente ligados a la celulosa (Tong y Gross, 1988).

Como se dijo, el ablandamiento excesivo es el principal factor que limita la vida poscosecha de las frutas (Brummell y Harpster, 2001). El desensamble de la pared celular de un fruto es uno de los principales procesos responsables de los cambios de textura durante la maduración. Este se asocia con cambios bioquímicos en fracciones de la pared celular, resultando en la solubilización y depolimerización de los polímeros de la pared celular, tales como celulosa, hemicelulosas y pectinas (Brummell, 2006;

Payasi y col., 2009). En el caso puntual de tomate no existe evidencia de depolimerización de celulosa (Brummell, 2006). En el desensamble de la pared celular vegetal intervienen diversas enzimas, descritas brevemente en el punto 1.2.2.2. En particular, las expansinas (enzimas no hidrolíticas) desempeñan un papel importante en el metabolismo de la pared celular y en el ablandamiento del fruto (Cosgrove, 2000; Payasi y col, 2009; Rose y col., 1997). Debido a la heterogeneidad de la composición de la pared celular, varias proteínas endógenas deben actuar en sinergismo para degradarla. En tomate, dentro de las enzimas que modifican a las pectinas, la actividad de poligalacturonasa (PG) es inusualmente más alta, caso contrario a lo que se observa con la actividad de la endo(1-4)  $\beta$ -D-glucanasa (EGasa) (Brummell y Harspter, 2001). Sin embargo, frutos de líneas transgénicas suprimidas en PG mediante la expresión de un transgen antisentido, maduraron normalmente y presentaron un ablandamiento comparable al fruto tipo salvaje, con sólo una ligera atenuación en la firmeza (Hadfield y Bennett, 1998). Esto muestra que la supresión de un único gen no siempre conlleva a un cambio global en la fisiología del fruto.

Respecto a las expansinas en tomate, se ha demostrado la expresión de una familia de genes en diferentes tejidos y momentos fisiológicos, aunque uno de ellos (*LeExp1*, actualmente *SlEXPA1*) participaría activamente del ablandamiento del fruto (Brummell y col., 1999; Rose y col., 1997).

### **1.4.1. Las expansinas en el ablandamiento del fruto de tomate**

La existencia de la primera expansina en tomate fue demostrada por Rose y col (1997), quienes hallaron un gen (*LeExp1*, actualmente denominado *SIEXPA1*) cuya expresión era específica de fruto y aumentaba durante la maduración

En 1999 Brummell y col. realizaron un estudio analizando 6 expansinas presentes en tomate (*SIEXPA1*, *SIEXPA3-A7*). Sus resultados corroboraron que *SIEXPA1* era fruto específica, y dependiente de la maduración. La expresión del gen se detecta con la aparición del color anaranjado del fruto (estadio pintón) en el caso del cv. Bonnie Best similar a lo observado por Rose y col. (1997) para el cv. T5. En el caso de *SIEXPA3* y *SIEXPA5*, también se detectó expresión de ARNm durante la maduración del fruto. El nivel de expresión de *SIEXPA5* era muy bajo y se detectó solamente en las primeras etapas de la maduración, mientras que en el caso de *SIEXPA3* se observó expresión del gen durante todo el proceso de maduración. Cabe señalar que los niveles de ARNm de estos dos genes son sustancialmente más bajos que los de *SIEXPA1*. Por último, *SIEXPA4*, *-A6* y *-A7* sólo se expresan durante la división y expansión de los frutos; *SIEXPA6* específicamente se expresa marcadamente en las etapas finales de expansión celular del fruto (Brummell y col., 1999).

En línea con esto y corroborando los resultados previos, en 2015 Lu y col. identificaron 38 genes de expansinas en la planta de tomate y estudiaron el perfil de expresión de 23 de los mismos (*SIEXPA1-A12*, *-A14*, *-A18*, *-A24*; *SIEXPB1-B3*, *-B8*; *SIEXLA1*; *SIEXLB1*, *-B2*, *-B4*).

Los autores observaron que, la expresión de *SIEXPA1*, *SIEXPA11* y *SIEXPA12* poseen niveles de expresión muy superiores al resto (4 veces superiores a los del gen

de referencia), mientras que *SIEXPA6*, *SIEXPA14* y los cuatro genes *SIEXPB* poseen un nivel de expresión muy bajo ( $<0,1$  con respecto a la expresión del gen de referencia) en todos los órganos examinados. El resto de los genes analizados exhibieron un nivel de expresión relativa de 0,1-1,5 veces la expresión del gen de referencia en el caso de expresarse. La mayoría de los genes mostraron un patrón de expresión órgano-dependiente. Algunos genes se expresaron en raíces (*SIEXPA3*, -A9, -A18; *SIEXPB1*, -B2, -B8; *SIEXLB2*, -B4), mientras que en fruto, *SIEXPA1*, -A3, -A5, -6; *SIEXPB8* y *SIEXLB1* fueron los genes que presentaron algún nivel detectable de expresión. Entre éstos, *SIEXPA1* se expresó específicamente a partir del estadio pintón (aparición de la coloración anaranjada sobre la piel del fruto); *SIEXPB8* se expresó preferentemente en frutos rojizos, *SIEXLB1* se expresó preferentemente a partir del estadio pintón, y *SIEXPA3*, -A5 y -A6 poseen un perfil de expresión que no es específico de fruto. El análisis conjunto de los resultados de este estudio y de los reportes previos de Rose y col. (1997) y Brummell y col. (1999) indica que la expresión de *SIEXPA1* es fruto específico y podría contribuir, de modo muy significativo, al desensamble de la pared celular y el ablandamiento del fruto de tomate durante la maduración.

Brummell y col. (1999b), aportaron evidencias significativas de la participación de las expansinas en el proceso de ablandamiento de frutos. Los autores desarrollaron líneas de tomate antisentido para el gen *SIEXPA1*, cuyos frutos resultaron ser más firmes que los frutos controles. Asimismo, desarrollaron líneas transgénicas sobreexpresantes de este gen y las mismas produjeron tomates más blandos que los controles (Brummell y col., 1999b).

## ***2. OBJETIVOS***

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es elaborar una estrategia que permita controlar la degradación de la pared celular y el ablandamiento de frutos, mediante la sobreexpresión de módulos de unión a carbohidratos (CBMs) en la pared celular, empleando tomate como sistema modelo.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desarrollar una adaptación metodológica “*ad-hoc*”, con un texturómetro comercial, que nos permita medir la actividad expansina de frutos de distintas especies, en diferentes estadios de madurez fisiológica, usando diversas matrices vegetales;
- ✓ Clonar la expansina 1 de tomate completa (*SIEXPA1*), el dominio catalítico putativo (*EXP-SIEXPA1*) y el dominio de unión a carbohidratos (*CBM-SIEXPA1*) en un vector de expresión en *Escherichia coli*, a fines de obtener las proteínas recombinantes correspondientes. Ensayar la capacidad de unión “*in vitro*” de las diferentes proteínas obtenidas sobre diferentes polisacáridos de la pared celular (celulosa, xilano, pectinas);
- ✓ Obtener plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv. *Ailsa Craig*) sobreexpresantes de *CBM-SIEXPA1* en la pared celular. Analizar el efecto de la sobreexpresión o sobre la degradación de pared celular, el ablandamiento y parámetros de calidad del fruto (contenido de azúcares y ácidos, desarrollo de color, deterioro poscosecha).

# ***3. CAPÍTULO I***

***“ADAPTACIÓN METODOLÓGICA PARA LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD  
EXPANSINA USANDO UN TEXTURÓMETRO COMERCIAL”***



### **3.1. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

Es ampliamente conocido que paredes celulares aisladas se extienden transitoriamente cuando se las coloca bajo tensión a pH ácido (fenómeno conocido como “*crecimiento ácido*”), sin la participación de procesos de síntesis (Cleland y col., 1987). Estudios realizados en hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus*) y de otras especies permitieron determinar que la elongación asociada al crecimiento ácido era un proceso dependiente de enzimas (Cosgrove, 1989). En 1992, McQueen-Mason y col. demostraron que esta elongación era mediada por proteínas no hidrolíticas denominadas “*expansinas*”.

La mayoría de los estudios realizados sobre expansinas fueron sobre la expresión de ARNm mediante Northern-blot, RT-qPCR, microarrays o expresión de proteínas mediante Western-blots, mientras que su actividad biológica ha sido escasamente analizada debido a dificultades experimentales. Dado que estas proteínas no poseen una actividad enzimática hidrolítica conocida, la evaluación de su actividad biológica se realiza mediante la medición de su capacidad para aumentar la relajación a la tensión o deformación de las paredes celulares aisladas haciendo uso, por lo general, de hipocótilos de pepino como matriz vegetal. (McQueen-Mason y col., 1992; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Esta medida de actividad expansina se ha realizado mediante el uso de extensómetros contruidos “*ad hoc*” (McQueen-Mason y col., 1992; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995), y se han reportado apenas unos pocos intentos de utilizar equipos comerciales (Goulao y col., 2007). Este hecho, junto con el laborioso análisis de datos implicado en la evaluación de la actividad expansina, ha restringido su determinación a unos pocos laboratorios en todo el mundo.

A través de los años, se han desarrollado diversas metodologías con el fin de medir diferentes aspectos de la mecánica de la pared celular. Los métodos más relevantes utilizando extensómetros son: -resistencia a la rotura; -determinación de elasticidad y plasticidad; -relajación a la tensión; y -elongación de la pared celular (Cosgrove, 2011). Según Cosgrove, la medida de la elongación de la pared celular a pH ácido imita el proceso de extensión de la pared “*in vivo*”, y permite distinguir fácilmente entre las paredes que están en crecimiento de aquellas que no lo están para muchos tejidos de una planta. Además, esta técnica es la más sensible para determinar la actividad de expansinas, por lo que cual es la más apropiada para evaluar la actividad de estas proteínas (Cosgrove 2011).

Es por esto que, en el presente capítulo, se describen los estudios realizados para adaptar y validar una metodología para medir la extensibilidad de una pared celular aislada y estimar la actividad expansina mediante el uso de un texturómetro comercial (equipos comunes que se encuentran en los laboratorios dedicados a la ciencia de los alimentos o la tecnología poscosecha). La disponibilidad de una metodología más simple y fiable para medir la actividad expansina podría facilitar su cuantificación y evaluación, aumentando el conocimiento de las propiedades de estas relevantes enzimas no hidrolíticas.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Desarrollar una adaptación metodológica “*ad-hoc*”, con un texturómetro comercial, que nos permita medir la actividad expansina de frutos de distintas especies, en diferentes estadios de madurez fisiológica, usando diversas matrices vegetales.

### **3.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1. Material vegetal**

##### *3.3.1.1. Matriz vegetal*

Los hipocótilos de pepino (*Cucumis sativus* cv. Poinsett) y tomate (*Solanum lycopersicum* cv Ailsa Craig) se obtuvieron de la siguiente manera. Alrededor de 100 semillas se esterilizaron con 4% (p/v) NaClO [hipoclorito de sodio], y se lavaron cinco veces con abundante agua destilada para luego ser sembradas en tierra:perlita (3:1). Estas semillas se llevaron a una cámara fría (4 °C) en oscuridad por el lapso de 4 días y, posteriormente se las expuso a un pulso de luz durante 6 h. Por último, se las dejó germinar en oscuridad a 28 °C durante: 4 días en el caso de pepino y 6 días para tomate. Se seleccionaron hipocótilos entre 8-10 cm de longitud, a los que se les cortaron los primeros 3 cm de la sección apical. Estas secciones se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C, durante no más de una semana.

##### *3.3.1.2. Extractos proteicos*

Frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Ailsa Craig) se obtuvieron de plantas cultivadas en invernadero bajo condiciones de luz natural en La Plata (Buenos Aires, Argentina). Los estadios de madurez usados fueron: Verde Maduro (VM), Pintón (Pi), Rojizo (R), Maduro (M) y Sobre-Maduro (SM) (los parámetros utilizados para clasificar a los frutos de tomate en los diferentes estadios de madurez se detallan en la Tabla 3.1. y Figura 3.1.). El pericarpio de los frutos se diseccionó, congeló en nitrógeno líquido y almacenó a -20 °C, hasta su uso.

Tabla N° 3.1. Clasificación de los diferentes estadios de madurez de tomate.

Estadio de madurez	Abreviatura	Eq. del ingles*	Descripción
<b>Verde Maduro</b>	<b>VM</b>	Mature Green (MG)	Fruto desarrollado; piel completamente verde con tonalidades claras u oscuras.
<b>Pintón</b>	<b>Pi</b>	Breaker (Br)	Hasta 20% de la superficie del fruto con colores amarillos y anaranjados a rojos
<b>Rojizo</b>	<b>R</b>	Pink (Pi)	Hasta 60% de la superficie del fruto con colores amarillo, anaranjado a rojos.
<b>Maduro</b>	<b>M</b>	Red ripe (RR)	Hasta 90% de la superficie del tomate con colores rosados o rojo
<b>SobreMaduro</b>	<b>SM</b>	Over red ripe (OR)	Más del 90% de la superficie del tomate con color rojo.

\* Léase: equivalencia del inglés.

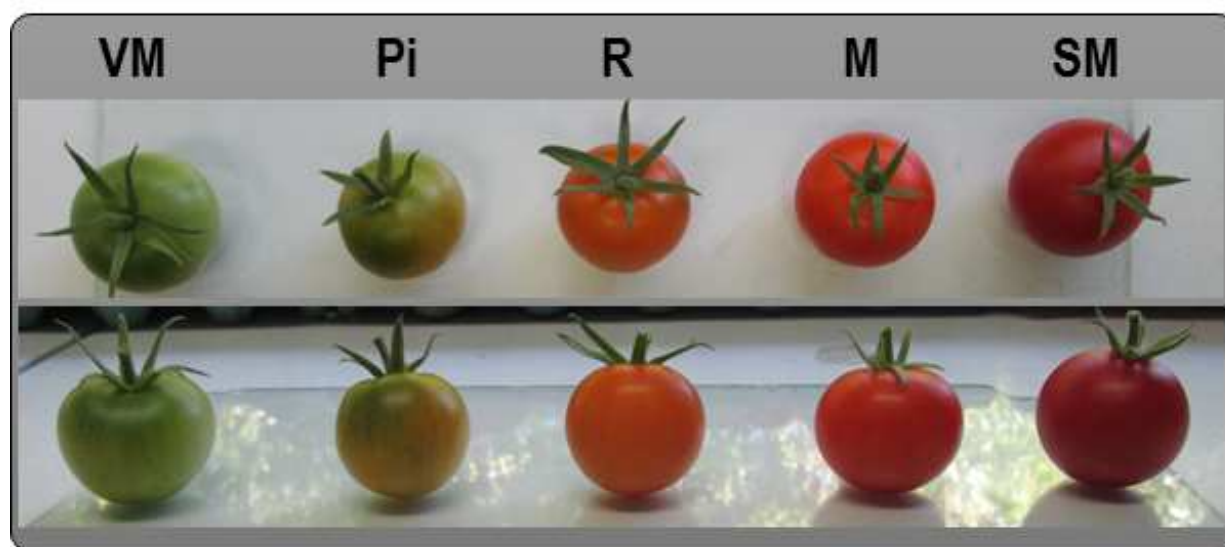


Figura 3.1. Fotografía representativa de los diferentes estadios de madurez de tomate usados a lo largo de las experiencias.

Verde maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); Maduro (M); Sobremaduro (SM).

Frutos de frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch., cv Camarosa) se obtuvieron de productores locales (La Plata, Provincia de Buenos Aires, Argentina) y el estadio de madurez empleado fue 100% Rojo (100%R). Los frutos se diseccionaron, congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -20 °C, hasta su uso.

### **3.3.2. Medida de crecimiento ácido de la pared celular y actividad expansina**

#### *3.3.2.1. Acondicionamiento de los hipocótilos*

Hipocótilos congelados se pulieron ligeramente con arena de cuarzo y se lavaron con abundante agua destilada. Luego se colocaron entre dos porta-objetos y se los comprimió con un peso de 500 gr por 5 min.

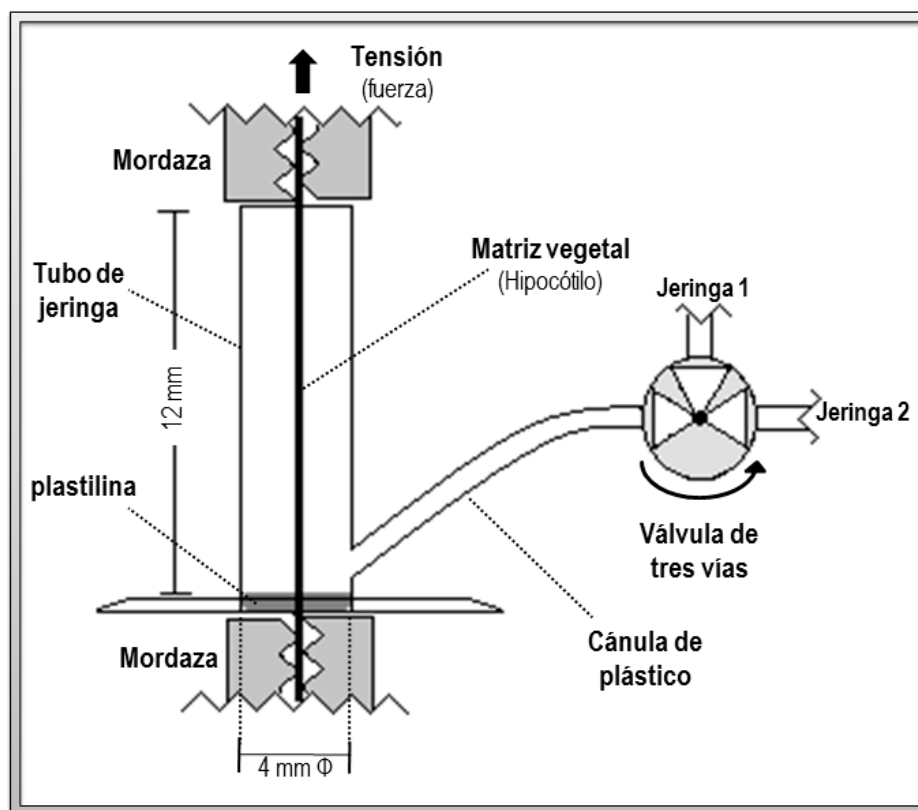
Algunos hipocótilos se almacenaron a 4 °C para ser utilizados durante el día (hipocótilos nativos), mientras que otros se inactivaron térmicamente. Para ello, los hipocótilos comprimidos se sumergieron en agua destilada a 95 °C durante 20 s (hipocótilos inactivados térmicamente, HIT) y se almacenaron a 4 °C para ser utilizados durante el día.

#### *3.3.2.2. Ensayo de crecimiento ácido de la pared celular*

Las mediciones se realizaron haciendo uso de un texturómetro comercial (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Texture Technologies®, Scarsdale, NY), equipado con mini-mordazas (A/MTG), y una celda de carga PL/CEL/30, de 30 kg de carga máxima. El protocolo de medida se adaptó en base al utilizado por Cosgrove (1989), como se describe a continuación.

La medida se realizó utilizando una cubeta *“ad hoc”*, la cual se construyó a partir de la sección del cilindro de una jeringa de plástico de 1 mL. Las dimensiones de la cubeta fueron: 12 mm de longitud, 4 mm de diámetro externo, y un volumen aproximado de 200  $\mu$ L. Sobre la pared lateral inferior de la cubeta se practicó un pequeño orificio para adaptar una cánula de plástico (diámetro interno de 1 mm, 30 cm de longitud) conectado en el otro extremo a una válvula de 3 vías. Esta válvula permitió

la conexión de dos jeringas de 5 mL que fueron usadas para cambiar los buffers sin tener necesidad de tocar la cuba, ni tener que pausar el funcionamiento del equipo (Figura 3.2). Dado que el extremo inferior de la cubeta es abierto, una vez introducido el hipocótilo, se selló dicho extremo con una pequeña cantidad de arcilla (plastilina comercial) para impedir la fuga de líquidos.



**Figura 3.2. Representación esquemática de la cubeta "ad hoc" empleada en las determinaciones realizadas.**

La cubeta "ad-hoc" (12 mm de longitud, 4 mm de diámetro externo, y un volumen aproximado de 200  $\mu$ L) posee un orificio sobre la pared lateral inferior para adaptar una cánula de plástico (diámetro interno de 1 mm, 30 cm de longitud) conectado en el otro extremo a una válvula de 3 vías. Esta válvula permitió la conexión de dos jeringas de 5 ml que fueron usadas para cambiar los buffers.

Para realizar los ensayos ya sea con hipocótilos de pepino o tomate nativos o inactivados térmicamente, los mismos se colocaron en la cubeta "ad-hoc", y sus extremos se aseguraron con las mini-mordazas con las que cuenta el equipo. La cubeta

se llenó con buffer HEPES 50 mM [4- (2- hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico ácido], pH 6,8, y el medidor de textura se puso en el modo de tensión aplicando una fuerza constante sobre el hipocótilo (20 gr para hipocótilos de pepino y 10 gr para el caso de hipocótilos de tomate) durante toda la prueba. Se mantuvieron estas condiciones durante 900 s y, posteriormente, el buffer se reemplazó rápidamente por HAc/NaAc 50 mM [ácido acético/acetato de sodio] pH 4,5 utilizando la válvula de tres vías, y se continuó con el ensayo por 3100 s más. Los datos (fuerza, tiempo, distancia) correspondientes a la totalidad del tiempo del ensayo (4000 s) se adquirieron a través del programa con el que cuenta el equipo (Exponent Lite Analysis Program ®), a una tasa de adquisición de 1 dato por segundo.

Para el correcto análisis de los datos, se define la ***tasa de elongación*** como: la elongación del hipocótilo correspondiente a la etapa realizada a condiciones de pH 4,5, y se expresa en micrómetros por minuto ( $\mu\text{m min}^{-1}$ ). Para cada condición se realizaron 10 réplicas.

En el caso de ensayos de crecimiento ácido destinados a analizar el efecto de la urea o NaCl en la tasa de elongación de la pared celular, el buffer HAc/NaAc 50 mM pH 4,5 se suplementó con urea 8 M o NaCl (0,1 M, 1 M, o 3 M), y la medición se realizó como se mencionó anteriormente. Para cada condición se realizaron 5 réplicas.

### *3.3.2.3. Ensayo de determinación de la actividad expansina*

La determinación de la actividad expansina se realizó sobre extractos de proteínas de diferentes fuentes usando como matrices vegetales hipocótilos inactivados de pepino y de tomate. Dichos hipocótilos fueron condicionados y colocados en el dispositivo de medida como se describió anteriormente.



La medida de la actividad expansina se basa en un ensayo de reconstitución de la actividad endógena de la matriz vegetal empleada. Es por ello que se utilizan hipocótilos inactivados térmicamente y se adiciona un extracto proteico en las condiciones de pH donde se observa el fenómeno de crecimiento ácido (pH4,5). De este modo, el ensayo se inicia con un buffer HAc/NaAc 50 mM pH 4,5 sin extracto proteico, el cual es reemplazado luego de 900 s de iniciado el ensayo por el extracto proteico en el mismo buffer y se continúa con el ensayo por 3100 s adicionales.

Considerando que existen diversas formas de expresar estos resultados, se decidió detallar claramente tres formas de expresar la actividad expansina. Para ello, se define:

**Actividad expansina:** se define como la tasa de elongación total del hipocótilo inactivado térmicamente, correspondiente a la etapa realizada a pH 4,5 con el extracto proteico (a partir de los 900 s de ensayo) y se expresa en micrómetros por minuto ( $\mu\text{m min}^{-1}$ ).

**Actividad expansina neta:** se define como la diferencia entre la tasa de elongación del hipocótilo inactivado con el extracto proteico en la condición de pH 4,5 (a partir de los 900 s de ensayo), y la media de la tasa de elongación del control (la elongación mecánica de la pared celular de los hipocótilos inactivados térmicamente). Se expresa en micrómetros por minuto ( $\mu\text{m min}^{-1}$ ).

**Actividad expansina específica:** se define como la actividad expansina neta por microgramo de extracto de proteína total, y se expresa en micrómetros por minuto, y por  $\mu\text{g}$  de proteína total ( $\mu\text{m min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ ) (Belfield y col., 2005).

De todas las determinaciones se realizaron tres réplicas biológicas y de cada réplica biológica se realizaron tres réplicas técnicas.

#### *3.3.2.4. Obtención de extractos proteicos*

Los extractos proteicos usados para la determinación de la actividad expansina se prepararon de acuerdo al siguiente detalle:

##### *3.3.2.4.1. Hipocótilos de pepino*

El siguiente protocolo se adaptó de McQueen-Mason y col. (1992). Hipocótilos de pepino (5 g) se pulverizaron en nitrógeno y se resuspendieron en 50 ml de buffer A (50 mM HAc/NaAc, pH 4,5; 2 mM EDTA [ácido etilendiamino tetra acético], 1 mM PMSF [fluoruro de fenil metil sulfonilo]). La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. El sedimento se lavó con buffer A en una relación 1:1 (v/v) y se centrifugó a 10.000 g durante 30 min a 4 °C.

El sedimento se resuspendió en buffer B (50 mM HEPES, pH 6,8; 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 3 mM metabisulfito de sodio), y se extrajo por 1,5 h en agitación a 4 °C. A continuación, el extracto se centrifugó a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se recolectó y la proteína total extraída se precipitó con acetona en una relación 3:1 (v/v) a -20 °C durante 15 min. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 5 min, el sedimento se lavó con acetona fría y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores. La fracción proteica se resuspendió en buffer C (50 mM HAc/NaAc pH 4,5) y se almacenó a 4 °C durante no más de una semana.

#### *3.3.2.4.2. Frutos de frutillas*

Este protocolo se adaptó de Harrison y col. (2001). Cinco gramos de frutillas se trituraron en nitrógeno líquido, se re-suspendieron en 25 ml de buffer D (25 mM MOPS [3- (N-morfolino) propanosulfónico] pH 7,0, 0,5% w/v de CTAB [bromuro de cetil trimetil amonio], 30% p/v de glicerol) y se homogeneizaron a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 10.000 g durante 5 min a temperatura ambiente, se recogió el sobrenadante, se filtró con papel de filtro y el sobrenadante se precipitó con acetona fría en una relación 3:1 (v/v) durante 15 min a -20 °C.

La suspensión se centrifugó a 5.000 g durante 10 min a 4 °C, y el sedimento se lavó con el mismo volumen de acetona fría. Finalmente, la fracción de proteína se secó al vacío, se resuspendió en 3 ml de buffer C (50 mM HAc/NaAc, pH 4,5) y almacenó a 4 °C durante no más de una semana.

#### *3.3.2.4.3. Frutos de tomate*

El siguiente protocolo se adaptó de Rose y col. (2000). Cinco gramos de frutos de tomates congelados se pulverizaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 25 ml de buffer E (50 mM HEPES, pH 7,0, 5 mM DTT [ditiotreitól], 3 mM metabisulfito de sodio, 2 mM EDTA, 0,1% p/v polivinilpirrolidona [Mr = 40.000], y 0,1% v/v Triton X-100) frío en una relación de 1 g de tejido / 3 ml de buffer.

Las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 10.000 g durante 30 min. El precipitado se lavó tres veces con 25 ml de agua destilada fría con la correspondiente centrifugación. El precipitado se sometió a la extracción proteica con 50 mL de buffer F (50 mM de HEPES, pH 7,0, DTT 5 mM, metabisulfito de sodio 3 mM, EDTA 2 mM, y 1,5 M NaCl), a 4 °C durante 12 h con agitación. La suspensión se

centrifugó como se describió anteriormente. El precipitado se extrajo nuevamente con 10 mL del mismo buffer durante 2 h a 4 °C y se centrifugó en las mismas condiciones que antes. Las dos fracciones extraídas se mezclaron y la precipitación de proteínas se indujo mediante la adición de sulfato de amonio a una concentración final de 0,4 g mL<sup>-1</sup>. La suspensión se agitó a 4 °C durante toda la noche, y se centrifugó a 10.000 g durante 30 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado de proteína se resuspendió en 3 mL de buffer G (buffer F pero sin NaCl).

#### *3.2.2.5. Cuantificación de proteínas*

Todas las cuantificaciones de proteínas se realizaron mediante el ensayo de Bradford usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

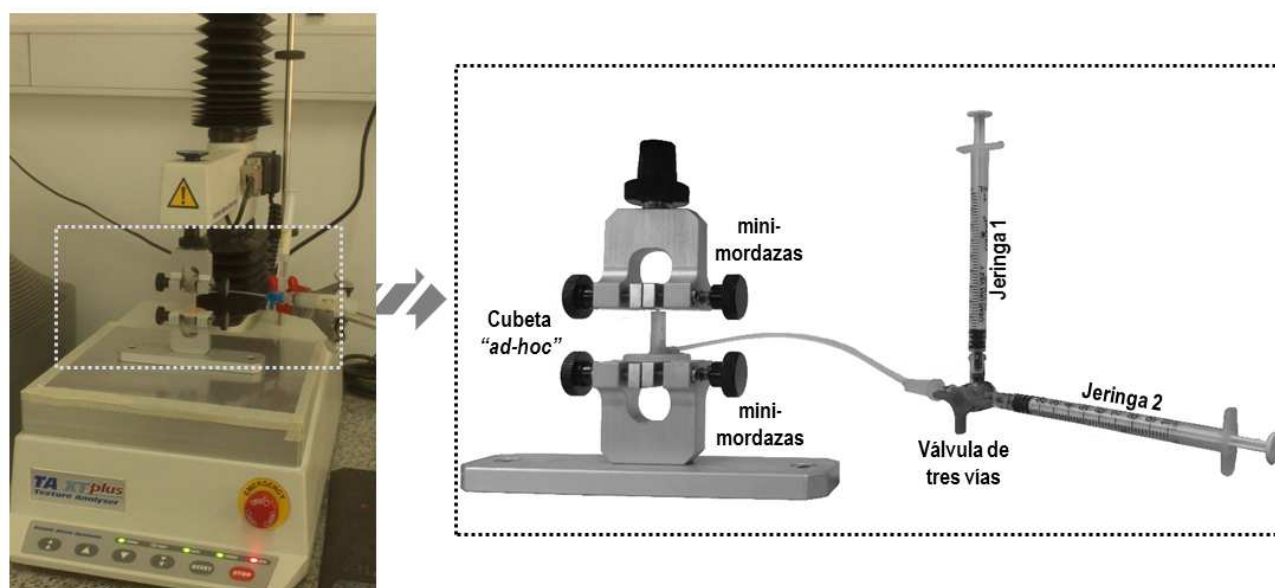
#### **3.3.3. Análisis estadístico**

Los datos de crecimiento ácido y de actividad expansina fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) o la prueba de Dunnett ( $p < 0,05$ ) según correspondiera.

### 3.4. RESULTADOS

Como se mencionó previamente, nuestro objetivo principal fue adaptar una metodología que nos permitiera medir el fenómeno de crecimiento ácido sobre una pared celular aislada y la actividad expansina mediante el uso de un texturómetro comercial.

Para ello, se construyó una cubeta de medida "ad-hoc" de modo de utilizarla en un texturómetro comercial (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Texture Technologies®, Scarsdale, NY) (Figura 3.3).



**Figura 3.3. Representación fotográfica del equipo y de la cubeta "ad hoc" empleados para realizar la medida de crecimiento ácido y de actividad expansina.**

Las soluciones usadas en el ensayo de crecimiento ácido fueron: buffer 50 mM HAc / NaAc pH 4,5 (jeringa 1) y buffer 50 mM HEPES pH 6,8 (jeringa 2). Para el caso del ensayo de actividad expansina: buffer 50 mM HAc/NaAc pH 4,5 (jeringa 1) y extracto proteico en buffer 50 mM HAc/NaAc pH 4,5 (jeringa 2).

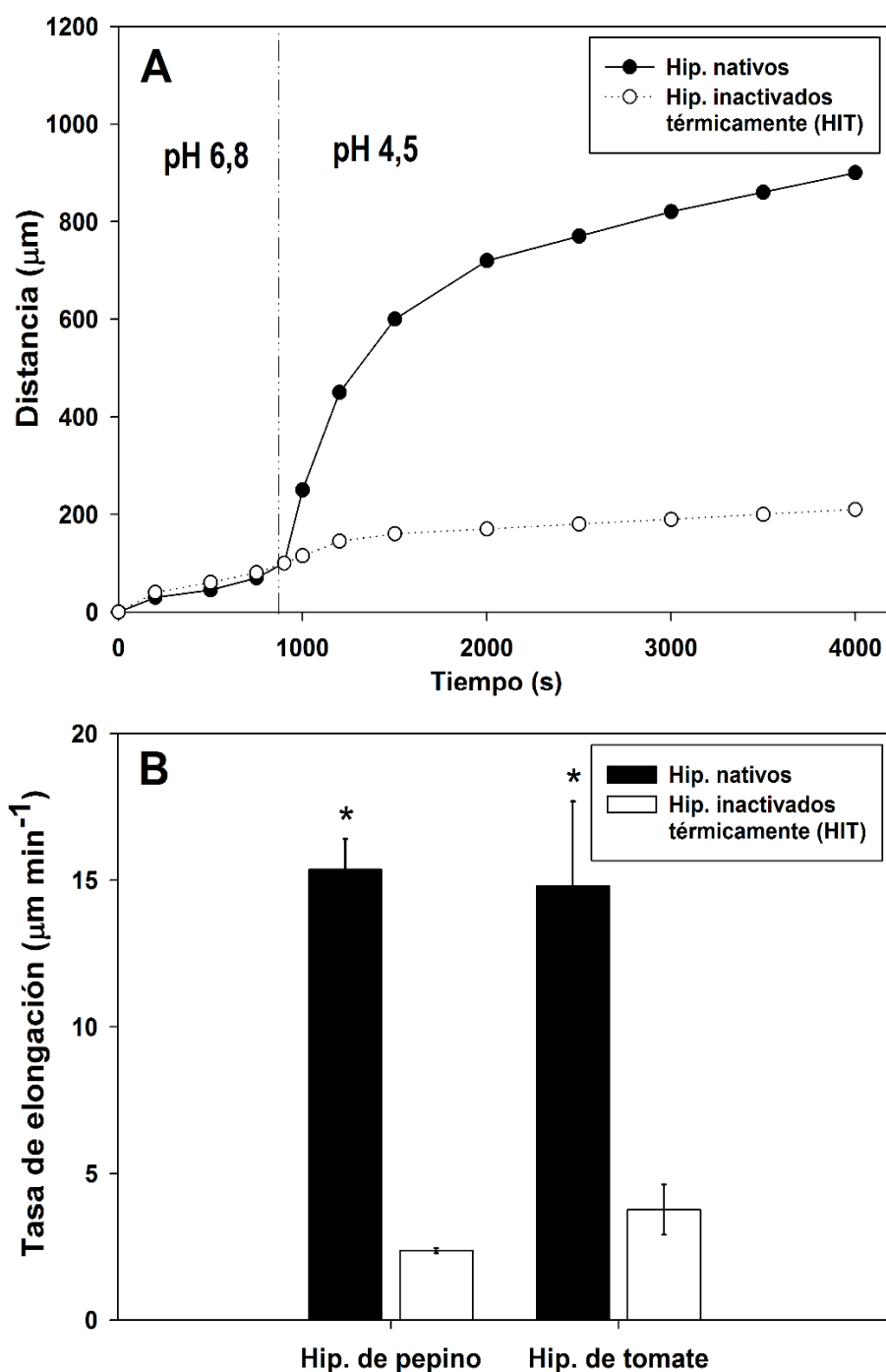
#### 3.4.1. Ensayos de crecimiento ácido de la pared celular

Con el fin de demostrar la fluencia de la pared celular y optimizar la metodología, los ensayos de crecimiento ácido se realizaron usando dos matrices vegetales distintas, hipocótilos de pepino e hipocótilos de tomate.

Una vez ajustados los hipocótilos adecuadamente en el dispositivo desarrollado, la celda se llenó con buffer HEPES 50 mM pH 6,8, el ensayo comenzó, siendo los hipocótilos sometidos a un esfuerzo de tensión constante durante 900 s; posteriormente, sin detener el ensayo, se reemplazó el buffer original por un buffer HAc/NaAc 50 mM pH 4,5, y el ensayo se continuó por 3100 s. Durante el lapso del ensayo los datos fueron registrados por el software con el que cuenta el equipo.

Para facilitar la interpretación de los resultados, se definió la tasa (velocidad) de elongación del hipocótilo como la elongación del hipocótilo correspondiente a la etapa realizada a pH 4,5 expresada en  $\mu\text{m min}^{-1}$ . En la Figura 3.4-A, se muestran curvas características de elongación de un hipocótilo nativo y de un hipocótilo inactivado térmicamente al realizarse el cambio del buffer circundante. En dicha representación se puede observar que la respuesta al cambio del medio, es inmediata.

Los resultados mostraron que la elongación de hipocótilos nativos de pepino y tomate aumentó significativamente una vez que el pH del buffer circundante se cambió de pH 6,8 a pH 4,5 (Figura 3.4-B); mientras que no se observó ninguna respuesta con los hipocótilos inactivados térmicamente después del intercambio del buffer, que es consistente con el hecho de que el fenómeno de "*crecimiento ácido*" es un proceso dependiente de enzimas o proteínas con actividad biológica.

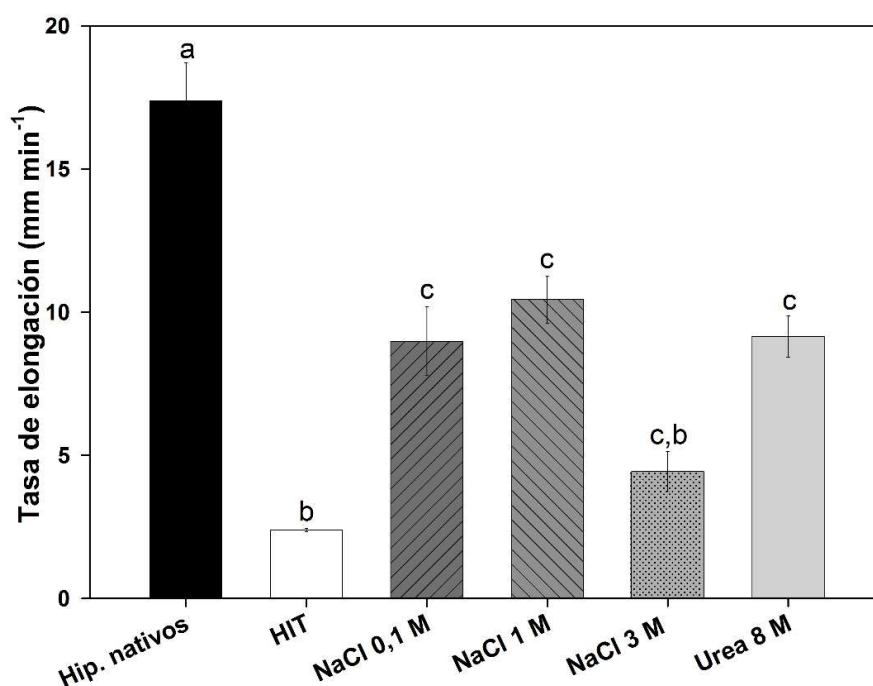


**Figura 3.4. Evaluación del crecimiento ácido haciendo uso de dos matrices vegetales.**

**A)** Representación esquemática de una curva de crecimiento ácido (distancia vs. tiempo) de hipocótilos de pepino. **B)** Tasa de elongación de hipocótilos nativos (barras negras) e inactivados térmicamente (HIT, barras blancas) de pepino y de tomate. Se realizaron diez repeticiones independientes y los datos corresponden a la tasa de elongación media  $\pm$  ES. Los resultados se analizaron por ANOVA; las medias se compararon mediante la prueba de Dunnett con  $p < 0,05$ . Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas entre los hipocótilos nativos e inactivados térmicamente de pepino o tomate, respectivamente.

### 3.4.2. Efecto de agentes químicos en el crecimiento ácido de la pared celular

Resultados previos demostraron que el fenómeno de crecimiento ácido es un proceso dependiente de enzimas, muy afectado por la presencia de proteasas y agentes caotrópicos (Cosgrove 1989). Por ende, en pos de validar nuestra adaptación metodológica y obtener mayor confianza en la sensibilidad de la determinación, se ensayó el efecto de dos agentes desnaturalizantes (urea y NaCl) en la determinación del crecimiento ácido de la pared celular usando como matriz vegetal hipocótilos de pepino.



**Figura 3.5. Efecto de agentes químicos sobre el crecimiento ácido de la pared celular.**

Se analizó el efecto de la urea (8M) y el cloruro de sodio (NaCl, 0,1 M, 1 M y 3 M) en la tasa de elongación de las paredes celulares aisladas de hipocótilos nativos de pepino. Hipocótilos nativos (Hip. Nativos); hipocótilos inactivados térmicamente (HIT). Los datos corresponden a la tasa de elongación media  $\pm$  ES de cinco determinaciones independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ . Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.



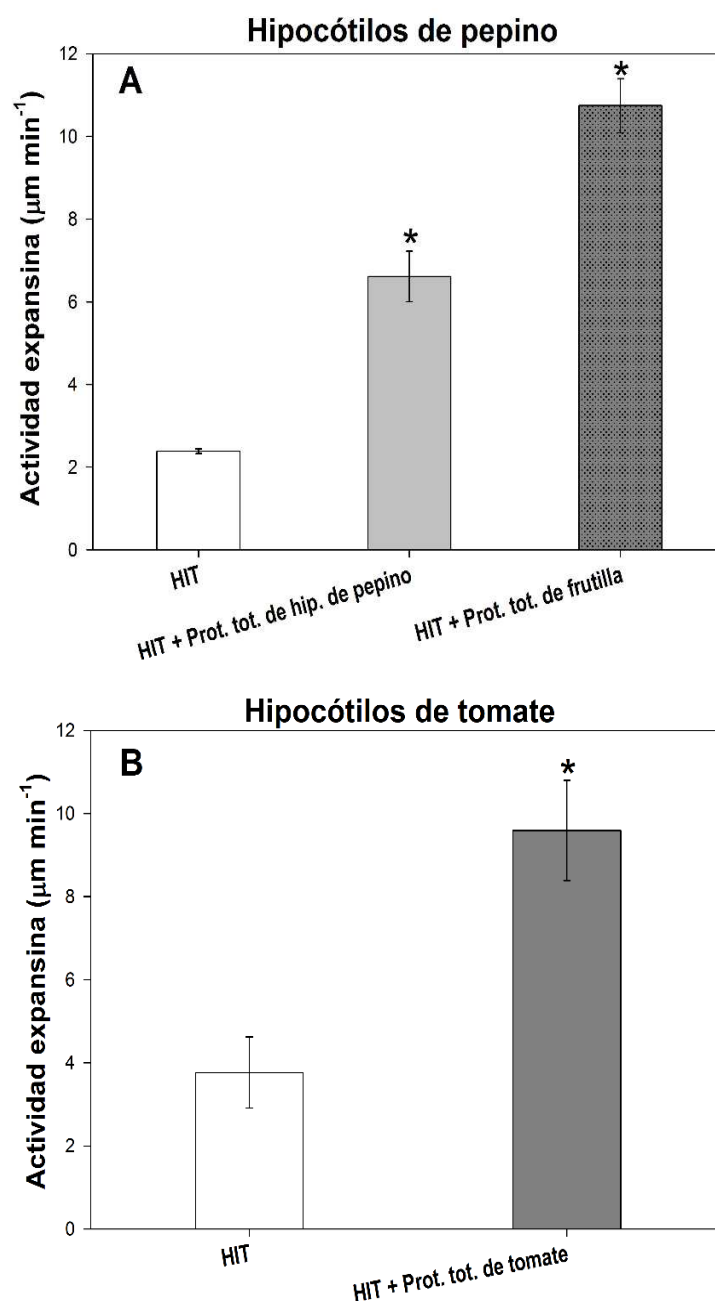
El agregado de ambos agentes desnaturalizantes (NaCl, urea) disminuyó significativamente la tasa de elongación de los hipocótilos de pepinos nativos (Figura 3.5). Para el caso del NaCl, a medida que su concentración aumenta existe una leve tendencia a disminuir la tasa de elongación, aunque la diferencia no logra ser estadísticamente significativa. Independientemente de ello, es importante mencionar que la disminución de la tasa de elongación del hipocótilo de pepino incluso con NaCl 0,1 M es comparable con la tasa de elongación cuando se agrega urea 8 M.

### **3.4.3. Determinación de la actividad expansina**

Una vez validada nuestra adaptación metodológica para determinar la elongación de la pared celular, el siguiente paso fue utilizarlo para medir la actividad expansina mediante la realización de un ensayo de reconstitución de la elongación de la pared celular de una matriz vegetal inactivada (hipocótilos inactivados térmicamente, HIT).

La actividad expansina se midió utilizando hipocótilos de pepino y tomate inactivados térmicamente como matrices vegetales, y extractos de proteínas totales de hipocótilos de pepino, de frutillas en un estadio de madurez avanzado (100 % Rojo) y de frutos de tomate maduro como fuente de expansina. La elección de estos extractos no fue arbitraria. El uso del extracto proteico de hipocótilos de pepino radica en que McQueen Mason y col. (1992) midieron por primera vez la reconstitución de la elongación de un hipocótilo inactivado usando un extracto proteico del mismo tejido. En el caso de los frutos de tomate y frutilla, se eligieron estadios avanzados de madurez fisiológica ya que en ambos frutos se conoce que la acumulación de ARNm de expansinas

específicas de fruto aumenta con el avance de la maduración (Harrison y col., 2001; Rose y col., 1997)



**Figura 3.6. Determinación de la actividad expansina utilizando dos matrices vegetales distintas.**

**A)** Hipocótilos de pepino inactivados térmicamente (HIT) y extractos de proteínas totales de hipocótilos de pepino o frutilla (100% R) ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); **B)** Hipocótilos de tomate inactivados térmicamente (HIT) y extracto de proteínas totales de frutos de tomate maduro ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los datos corresponden a la actividad expansina media  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados

por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Dunnett con  $p < 0,05$ . Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas entre los hipocótilos inactivados térmicamente de pepino o tomate y los extractos de proteína, respectivamente.

En primer lugar, se realizó un ensayo de reconstitución de la elongación de la pared celular usando hipocótilos de pepino desnaturalizados térmicamente como matriz vegetal y un extracto de proteínas totales de hipocótilos de pepino. Se observó que la tasa de elongación (actividad expansina) fue mayor que la elongación propia del hipocótilo inactivado térmicamente (HIT) (Figura 3.6-A). Asimismo, dicha matriz vegetal fue empleada para ensayar el extracto de proteínas totales de frutillas 100%R y se observó nuevamente que la tasa de elongación fue significativamente mayor que la correspondiente a los controles inactivados por calor, lo que indica la presencia de la actividad expansina en el extracto proteico ensayado (Figura 3.6-A). Esto también nos permitió mostrar el uso de esta técnica para la medida de la actividad expansina de un extracto proteico de diferente procedencia a la matriz vegetal empleada.

Por otro lado, se realizó un ensayo similar destinado a medir la actividad expansina en extractos de proteínas totales de frutos de tomate (Figura 3.6-B). En este caso, se utilizó como matriz de pared celular, a hipocótilos de tomate inactivados térmicamente, y se preparó un extracto de proteínas totales a partir de tomates maduros. Una vez más, se observó una tasa de elongación (actividad expansina) mayor estadísticamente significativa, luego del agregado del extracto proteico, indicando en este caso la presencia de actividad expansina en el extracto de tomates maduros.

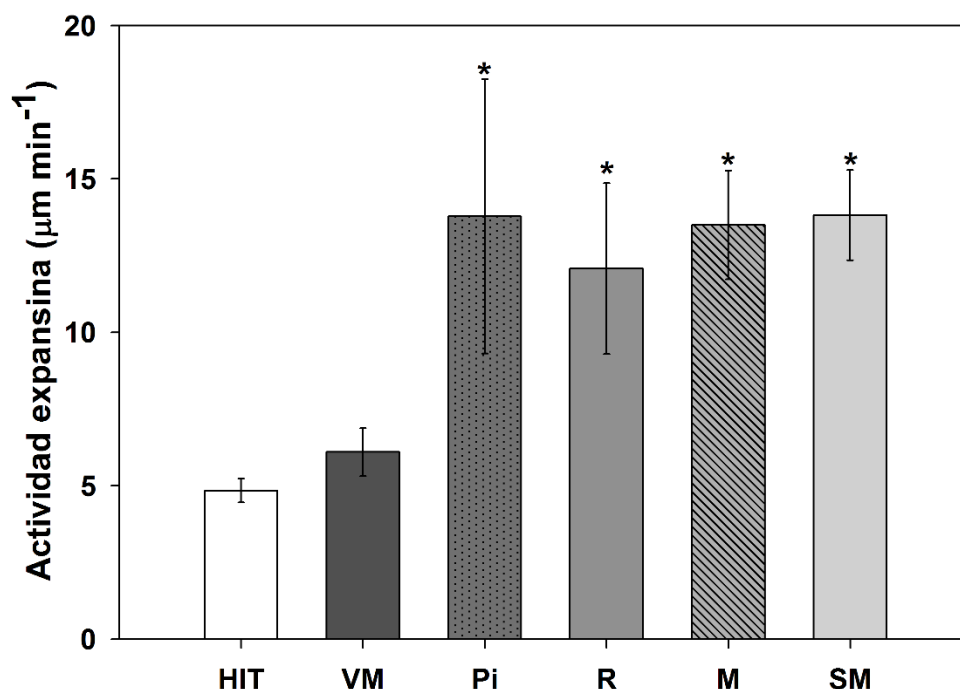
Resulta interesante mencionar que en el proceso de puesta a punto de la medida de la actividad expansina sobre frutos de tomate, fue ensayado el uso de HIT

de pepinos como matriz celular vegetal, aunque no fue posible obtener datos confiables y reproducibles (datos no mostrados).

#### *3.4.3.1. Determinación de actividad expansina en diferentes estadios de madurez de tomate*

Considerando que la metodología propuesta nos permitió determinar una actividad expansina en frutos de tomate maduros empleando como matriz vegetal hipocótilos de la misma planta, se decidió intentar generar un perfil de la actividad expansina con frutos de tomate en diferentes estadios de madurez fisiológica. Para ello, se generaron extractos proteicos (véase, sección 3.3.2.4.3) de cinco estadios de madurez diferentes de tomate; Verde Maduro (VM), Pintón (Pi), Rojizo (R), Maduro (M) y Sobre-Maduro (SM) (véase, Figura 3.1).

La actividad expansina observada luego del agregado de extractos de proteínas de frutos VM no difirió estadísticamente de la correspondiente al control, lo cual indica una baja actividad de expansina en dicho estadio (Figura 3.7). A partir del extracto de proteína totales de frutos de tomate en estadio Pintón (Pi), se observó un marcado aumento en la tasa de elongación de los HIT. Asimismo, los extractos proteicos de los estadios de madurez subsiguientes (R a SM), mostraron tasas de elongación similares al estadio Pi. El hecho de no observar variaciones en la actividad expansina a medida que los frutos de tomate maduran, puede deberse a que dicha actividad es similar durante estos estadios, o bien puede radicar en que la sensibilidad del método no nos permite diferenciarlos de manera apropiada. Independientemente de ello, fue posible cuantificar dicha actividad expansina en diferentes estadios de madurez fisiológica de frutos de tomate.



**Figura 3.7. Perfil de la actividad expansina durante la maduración de tomate.**

Se muestra la actividad expansina ( $\mu\text{m min}^{-1}$ ) presente en extractos proteicos de diferentes estadios de madurez de tomate: Verde maduro (VM), pintón (PI), Rojizo (R), rojo maduro (M) y sobre-maduro (SM). La concentración de proteína fue la misma en todas las determinaciones ( $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ). Los datos corresponden: a la actividad expansina media  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes para el caso donde se agregó el extracto proteico; o a la tasa de elongación media  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes de los hipocótilos de tomate inactivados térmicamente (HIT). Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Dunnett con  $p < 0,05$ . Los asteriscos indican diferencias estadísticas significativas respecto al control (hipocótilos de tomate inactivados térmicamente, sin agregado de extracto proteico).

#### 3.4.3.2. Actividad expansina: modos de expresión

Aun cuando la mayor parte de determinaciones de actividad expansina se basan en la metodología de la elongación de la pared celular, la definición y las unidades utilizadas para expresarla no son homogéneas entre los diferentes autores, lo cual dificulta la comparación entre distintos trabajos (Belfield y col., 2005; Harrison y col., 2001; Rose y col., 2000). A lo largo de este capítulo se decidió presentar los resultados como comúnmente se suelen presentar en los pocos trabajos donde ha sido medida. Sin embargo, en dichos trabajos científicos, no siempre son claras las

condiciones en las cuales se determina (concentración de proteína, tiempo de elongación, fuerza empleada, entre otros). Es por ello que se propone definir la actividad expansina y sus unidades con una convención similar a lo que se utiliza para enzimas regulares.

**Tabla 3.2.** Actividad expansina neta y actividad expansina específica.

Matriz Vegetal/ Fuerza aplicada	Extracto proteico	Act. Exp. Neta ( $\mu\text{m min}^{-1}$ )	Act. Exp. Específica ( $\mu\text{m min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ )
Hip. de pepino / 20 gr	Hip. de pepino (250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	4.23 $\pm$ 0.61	0.0169 $\pm$ 0.0024
	Frutilla 100%R (250 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	7.93 $\pm$ 0.73	0.0317 $\pm$ 0.0029
Hip. de tomate / 10 gr	Tomate VM (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	1,25 $\pm$ 0,78	0,0025 $\pm$ 0,0016
	Tomate Pi (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	6,24 $\pm$ 1,96	0,0125 $\pm$ 0,0039
	Tomate R (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	6,46 $\pm$ 2,14	0,0129 $\pm$ 0,0043
	Tomate M (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	7,30 $\pm$ 1,11	0,0146 $\pm$ 0,0022
	Tomate SM (500 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ )	5,66 $\pm$ 0,98	0,0113 $\pm$ 0,0020

Se realizaron 3 extracciones con 3 medidas independientes y los datos corresponden a la actividad expansina neta media  $\pm$  ES o a la actividad expansina específica media  $\pm$  ES. Entre paréntesis se muestran las concentraciones de cada extracto proteico que se analizó.

Por lo tanto, tal como se comentó en la sección 3.3.2.3, se define una *actividad expansina neta* restando la media de control negativo (tasa de elongación de hipocótilos inactivados térmicamente) a la tasa de desplazamiento total del hipocótilo con el extracto proteico, y se expresó como micrómetros por minuto ( $\mu\text{m min}^{-1}$ ). Además, se definió una *actividad expansina específica* como la actividad neta expansina por microgramo de extracto de proteína total, y se expresó en micrómetros por microgramos de proteína total por minuto de ensayo ( $\mu\text{m } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). En la Tabla 3.2., se resumen los

datos obtenidos tanto la expansina actividad neta como la actividad expansina específica de acuerdo con nuestras condiciones experimentales, denotando en cada caso el tipo de matriz de la pared celular, la fuerza de tensión aplicada, y la concentración de proteína total.

### **3.5. DISCUSIÓN**

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que la elongación de hipocótilos nativos de pepino y de tomate aumentó significativamente una vez que el pH del buffer circundante se cambió de pH 6,8 a pH 4,5 (Figura 3.4-B), mientras que no se observó ninguna respuesta después del intercambio de buffer en el caso de los hipocótilos inactivados térmicamente. Esto es consistente con el hecho de que el fenómeno de "*crecimiento ácido*" es un proceso dependiente de enzima tal como lo describió Cosgrove (Cosgrove, 1989).

En 1992, McQueen-Mason y col. demostraron que las paredes celulares inactivadas por calor de hipocótilos de pepino recuperaban su capacidad de extensión en presencia de una fracción purificada de proteína obtenida de hipocótilos de pepino nativos. Esta nueva familia de proteínas se denominó " $\alpha$ -expansinas", y desde su descubrimiento numerosos genes y proteínas de diferentes fuentes se han reportado y añadido a esta familia (Civello y col., 1999; Cosgrove 2000; McQueen-Mason y col., 1992; Rose y col., 1997). La actividad expansina se midió inicialmente a través de un ensayo de reconstitución que implica la elongación de la pared celular (McQueen-Mason y col., 1992), aunque otros métodos basados en la relajación de la tensión también fueron empleados (Cosgrove, 2011) (véase, sección 3.1).

En primera instancia, se realizó un ensayo basado en la reconstitución de la elongación de la pared celular, para ello se usaron hipocótilos de pepino inactivados térmicamente y un extracto de proteína total de hipocótilos de pepino. La tasa de elongación total fue determinada y empleada para evaluar la presencia de actividad de expansina (Figura 3.5-A). Se demostró que el extracto proteico total de hipocótilos de



pepino logró reconstituir parcialmente la capacidad de elongación de un hipocotilo de pepino inactivado térmicamente. Este resultado fue congruente con lo obtenido por McQueen-Mason y col. (1992) cuando logró reconstituir la capacidad de elongación de un hipocótilo de pepino inactivado con un extracto purificado de proteínas de dicho tejido.

El mismo ensayo se llevó a cabo usando extractos de proteína total de frutillas 100%R, y se demostró que la tasa de elongación en presencia del extracto proteico fue significativamente mayor que la correspondiente a los controles inactivados por calor, lo que indica la presencia de la actividad de expansina (Figura 3.4-A). Este resultado es avalado por informes anteriores que muestran los perfiles de expresión de  $\alpha$ -expansinas en frutilla, tanto a nivel de proteína como de ARNm. En 2006, Dotto y col. (2006) analizaron los niveles de expresión del transcripto de cinco expansinas diferentes (*FaEXPA1*, 2, 4, 5, y 6) en frutilla (*Fragaria*  $\times$  *ananassa Duch.*, cv. Camarosa). Según su informe, *FaEXPA4* y *FaEXP6* tienen una expresión constitutiva basal durante el desarrollo y maduración del fruto, mientras que *FaEXPA2* y *FaEXPA5* resultaron ser fruto específico con un aumento de su expresión durante la maduración del fruto. En cuanto a *FaEXPA1* no es fruto específica aunque su expresión más alta se observó en el receptáculo del fruto y aumentó durante la maduración del mismo (Dotto y col., 2006).

Por otro lado, Harrison y col. (2001) también analizaron la expresión de ARNm de seis expansinas (*FaEXPA* 2, 3, 4, 5, 6, 7) en frutos de frutilla, pero de otro cultivar (*Fragaria*  $\times$  *ananassa Duch.*, cv Brighthon). Ellos encontraron y definieron tres patrones de expresión durante el desarrollo y maduración del fruto: perfil arriba-abajo-arriba (*FaEXP3* y *FaEXP4*); perfil de abajo-arriba-abajo (*FaEXP6* y *FaEXP7*) y perfil aumento de la expresión durante la maduración del fruto (*FaEXP2*, *FaEXP5*).

Para el análisis del nivel de expresión proteico, Dotto y col. (2006) realizaron un estudio por inmuno-detección para la proteína total extraída de frutillas en diferentes etapas de maduración, mediante el uso de un anticuerpo heterólogo (anticuerpo anti expansina 1 de tomate, SIEXPA1). Sus resultados mostraron que la mayor acumulación de expansina correspondió al estadio de madurez 100%R mientras que en el estadio 50%R los niveles de proteína fueron muy bajos y en el estadio blanco (W, frutos casi totalmente expandidos, con la clorofila totalmente degradada y comenzando la síntesis de antocianinas) no se pudo detectar proteína. Por su parte, Harrison y col. (2001) realizaron un análisis por inmuno-detección similar con un anticuerpo heterólogo anti expansina 1 de pepino (CsEXPA1), encontrándose un perfil de expresión congruente con lo descripto anteriormente.

Asimismo, Harrison y col. (2001) ensayaron la actividad expansina sobre extractos proteicos de frutos de frutilla en diferentes etapas de maduración utilizando el equipo *ad-hoc* diseñado por Cosgrove (1989). En ese ensayo, se empleó una matriz sintética de 2 mm de ancho de celulosa/xiloglucano que se sometió a extensión bajo una fuerza constante (11 gr) en ausencia o en presencia de extractos de proteína a concentraciones de 150 mg mL<sup>-1</sup>. Los autores informaron que la actividad expansina aumentó durante la maduración del fruto, siendo muy baja la actividad en frutos de estadio de madurez blanco, aumentando exponencialmente hacia etapas posteriores de madurez, siendo de 20  $\mu\text{m min}^{-1}$  en estadio de madurez 100% R. Cabe señalar que este valor es similar al valor obtenido con nuestro equipo (aproximadamente una tasa de elongación de 15  $\mu\text{m min}^{-1}$ ) para el mismo estadio de madurez de la variedad *Fragaria × ananassa Duch.*, cv Camarosa aunque las condiciones de ensayo fueron distintas (HIT de pepino, fuerza constante de 20 gr).

Por otra parte, se realizó un ensayo destinado a medir la actividad expansina sobre extractos proteicos de frutos de tomate en cinco estadios de madurez distintos (VM, Pi, R, M y SM), usando hipocótilos de tomate inactivados térmicamente como matriz vegetal de la pared celular. Se observó un aumento muy marcado y estadísticamente significativo de la actividad expansina del estadio verde maduro al estadio pintón, manteniéndose la actividad expansina sin variaciones significativas durante el proceso de maduración del fruto.

Tal como se comentó en la introducción general de la presente tesis, Rose y col. (1997), aislaron y caracterizaron una expansina específica de fruto en tomate y observaron por Northern blot que su expresión aumentaba durante la maduración del fruto. En 1999 Brummell y col. realizaron un estudio analizando cinco expansinas presentes en tomate. Sus resultados mostraron que *SIEXPA1* era fruto específica, acumulándose solamente durante la maduración, apareciendo antes de la etapa de Pi en el caso del cv. Bonnie Best, similar a lo observado por Rose y col. (1997) para el cv. T5. De los cinco genes de expansina de tomate investigados, ninguno mostró un patrón de acumulación de ARNm similar a *SIEXPA1*, pero sí mostraron acumulación de ARNm en tejidos distintos al fruto, tal como hoja, tallo y flor. De estos cinco genes, sólo *SIEXPA3* y *SIEXPA5* mostraron ARNm detectable durante el ablandamiento del fruto. Sin embargo, el ARNm de *SIEXPA5* estuvo presente en niveles muy bajos sólo durante las primeras etapas de la maduración, mientras que el gen *SIEXPA3* se expresó en todos los estadios de maduración, pero a niveles sustancialmente más bajos que *SIEXPA1*. Esto sugiere que, si bien al menos otros dos genes de expansinas se expresan en el fruto durante la maduración, *SIEXPA1* es la principal expansina presente en las paredes celulares durante el ablandamiento del fruto de tomate. Estudios

recientes en los que se analizaron los niveles de ARNm de 23 expansinas de tomate (*SIEXPA1-A12, A14, A18, A24; SIEXPB1-B3, B8; SIEXLA1; SIEXLB1-B2, B4*) mostraron que la expresión de *SIEXPA1*, además de ser fruto específica, es sustancialmente más elevada en relación a las demás expansinas analizadas. Es importante mencionar que se detectaron algunas otras expansinas que se expresan durante la maduración. *SIEXPB8* se expresa preferentemente en frutos rojizos, *SIEXLB1* preferentemente a partir del estadio pintón, y *SIEXPA3, SIEXPA5* y *SIEXPA6*, si bien se expresan en fruto durante la maduración, poseen un perfil de expresión no fruto específico (Lu y col., 2015). De este análisis pormenorizado se desprende, tal como se venía comentando que es plausible asumir que la actividad expansina que estamos ensayando sea producto de la expansina 1 de tomate (*SIEXPA1*).

Rose y col., (2000) realizaron un análisis cualitativo de la actividad expansina en tomate, haciendo uso del equipo adaptado por Cosgrove (1989). Reportaron que la tasa de elongación (actividad expansina) de hipocótilos de pepino aumentaba con extractos proteicos de frutos de tomate de madurez fisiológica creciente. Estos resultados, sin peso estadístico cuantitativo, son similares a los obtenidos en nuestro caso. Cabe destacar que Rose y col. (2000) utilizaron como matriz vegetal de la pared celular hipocótilos de pepino inactivados térmicamente, mientras que, en nuestro caso, no pudimos optimizar el uso de dichos hipocótilos para obtener resultados confiables y reproducibles en la medida de la actividad expansina de extractos proteicos de frutos de tomate.

El foco de este capítulo fue obtener una adaptación metodológica que nos permitiese medir de manera confiable la elongación de una pared celular aislada y, como consecuencia poner a punto una metodología que nos permita determinar la

actividad expansina de diversos extractos proteicos. De ahí, que resulta interesante comentar que los resultados se obtuvieron con un medidor de textura comercial (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Texture Technologies®, Scarsdale, NY) equipado con una célula de carga PL/CEL/30, de 30 kg de carga máxima. El equipo ofrece la posibilidad de cambiar la celda de carga por otras más pequeñas como PL/CEL/5 o PL/CEL/1 de 5 kg o 1 kg de carga máxima, respectivamente. El uso de una celda de carga con un rango de carga inferior probablemente podría aumentar la precisión y la sensibilidad de las determinaciones. Cabe señalar que existen en el mercado texturómetros de similares características, pertenecientes a otras compañías, para los cuáles se podrían adaptar metodologías similares a las descriptas en este capítulo.

## ***4. CAPÍTULO II***

***“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE UNIÓN IN VITRO DE  
CBM-SLEXPA1, EXP-SLEXPA1 Y SLEXPA1”***

## 4.1. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Tal como se mencionó en la Introducción General, las expansinas poseen una organización modular que consta de un péptido tránsito que las dirige a la vía secretora, un dominio similar a endoglucanasas (dominio catalítico putativo) y un dominio de unión a carbohidratos (CBM) (véase, Figura 1.7).

McQueen-Mason y Cosgrove (1995) evaluaron la capacidad de unión de dos expansinas de hipocótilos de pepino a diversas fracciones de la pared celular, concluyendo que las expansinas se unen en la interfase ubicada entre las microfibrillas de celulosa y los polisacáridos de la matriz de la pared celular.

Si bien comenzaba a dilucidarse el mecanismo de acción de las expansinas, aún no se había establecido concretamente a través de qué dominio se realizaba la unión entre estas proteínas y sus sustratos. Shcherban y col., (1995) realizaron un alineamiento entre expansinas de diferentes especies y observaron que la mayoría de las secuencias analizadas poseían una serie de triptófanos conservados en el extremo C-terminal (*SIEXPA1* los posee). El espaciamiento entre los residuos de triptófano incluidos en este módulo se asemejaba al de los dominios de unión a la celulosa encontrados en celulasas (Gilkes y col., 1991; Hamamoto y col., 1992). A su vez, se determinó, mediante mutagénesis sitio-dirigida, que estos residuos aminoacídicos resultaban fundamentales para establecer la unión de las celulasas a celulosa (Poole y col., 1993). Todos estos indicios llevaron a postular que las expansinas se unirían a sus sustratos a través del CBM.

Se ha propuesto que este dominio CBM (dominio C-terminal) actuaría anclando a la expansina a la superficie de la celulosa, mientras el dominio N-terminal o dominio catalítico putativo interactuaría con las hemicelulosas en la superficie de las

microfibrillas o en la matriz (Cosgrove, 2000; Whitney y col., 2000) (véase, Figura 1.8). Dado que no se ha logrado detectar ninguna de las actividades conocidas características de las enzimas que actúan sobre la pared celular, se ha postulado que este dominio catalítico sería capaz de debilitar los enlaces puente de hidrógeno (enlaces no covalentes) que mantienen unidas las hemicelulosas a las fibrillas de celulosa (Cosgrove, 2000).

En relación a esto, en nuestro grupo de trabajo, se sobreexpresó el CBM de la expansina 2 de frutilla (*CBM-FaEXP2*) en *E. coli*, y se analizó la capacidad de unión de la proteína recombinante sobre diferentes sustratos. Los resultados indicaron que, *in vitro*, el dominio CBM se une principalmente a celulosa microcristalina, así como también a xilano de avena y pectinas de *citrus* (Nardi y col, 2013).

La presencia de CBMs no sólo se limita a las expansinas, ya que otras proteínas del metabolismo de pared celular vegetal también poseen este tipo de organización modular. Un ejemplo es la  $\alpha$ -arabinofuranosidasa, cuya presencia fue descrita durante la maduración de frutillas (Rosli y col., 2009). Nuestro grupo de trabajo, ensayó las capacidades de unión *in vitro* del CBM putativo predicho para la  $\alpha$ -arabinofuranosidasa y se observó una elevada afinidad por el pectato de calcio y una reducida afinidad por celulosa microcristalina (Sin y col., 2016).

En el caso de la expansina 1 de tomate, la misma posee la organización modular descrita para las demás expansinas. Hasta el momento, no existen reportes sobre las capacidades de unión de ninguna expansina de tomate sobre diferentes polisacáridos de pared celular *in vitro*. Asimismo, sería el primer estudio en caracterizar las capacidades de unión de una expansina en forma conjunta del dominio de unión a carbohidratos, el dominio expansina putativo y de la proteína completa. Este tipo de



análisis, propuesto en esta tesis, contribuiría al conocimiento de las propiedades y posibles mecanismos de acción de estas proteínas modulares apoplásticas.

## **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Clonar la expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1), el dominio catalítico putativo (EXP-SIEXPA1) y el dominio de unión a carbohidratos (CBM-SIEXPA1) en un vector de expresión en *Escherichia coli*, a fines de obtener las proteínas recombinantes correspondientes.
- ✓ Ensayar la capacidad de unión “in vitro” de las diferentes proteínas obtenidas sobre diferentes polisacáridos de la pared celular (celulosa, xilano, pectinas).

### 4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.3.1 Análisis in silico y clonado molecular

Los constructos para la expresión heteróloga del módulo de unión a carbohidratos (*CBM-SIEXPA1*), del módulo catalítico (*EXP-SIEXPA1*) y de la proteína completa de la expansina 1 de *Solanum lycopersicum* (*SIEXPA1*) en *Escherichia coli* fueron diseñados usando la tecnología de recombinación Gateway® (Invitrogen™).

En primer lugar, se realizó un análisis "*in silico*" utilizando los programas y bases de datos SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen y col., 2011) y PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>; Sigrist y col., 2013) para identificar y delimitar el péptido señal (SP) y los dominios conservados presentes en la proteína SIEXPA1, respectivamente. Una vez delimitadas las regiones, cada fragmento fue amplificado usando cebadores específicos sobre un plásmido que contiene el gen completo de *SIEXPA1* como molde.

Para el constructo *CBM-SIEXPA1* los cebadores utilizados fueron: **cebador 1:** 5' **GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**aatcagattaccatcaatgg ´3; **cebador 2:** 5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTA**tattttgaaattcttccgatg ´3. Para el constructo *EXP-SIEXPA1* los cebadores utilizados fueron: **cebador 3:** 5' **GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT**aggcggaagtgatgcttctg ´3; **cebador 4:** 5' **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTA**tcctccttgcttccggcatg ´3. Por último, para el constructo *SIEXPA1* los cebadores utilizados fueron: cebador 3 y cebador 2 (En el caso del cebador 1 y 3, en negrita se marca el sitio de recombinación attB1, mientras que en el caso del cebador 2 y 4 en negrita se marca el sitio de recombinación attB2; el subrayado indica el codón de stop).

Una vez generados y chequeados los productos de PCR, se generaron los clones de entrada entre el vector de entrada pDONR™221 (Invitrogen) y el producto de PCR mediante una reacción estándar de recombinación BP (sistema Gateway®). Dicho constructo fue secuenciado. Posteriormente, se generó el vector de expresión a través de una recombinación LR (sistema Gateway®) entre el vector de entrada (con el inserto correspondiente) y el vector de destino pDEST™17 (Invitrogen), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Este vector pDEST™17 tiene como característica saliente que posee una etiqueta (“tag”) de 6xHis (6 Histidinas en paralelo) en el extremo N-terminal de la proteína que se va a expresar. El promotor que conduce la expresión de las proteínas de interés es el T7-promotor (inducible por IPTG), y un gen de resistencia a ampicilina para la selección de las bacterias transformadas.

Cada una de las etapas fue seguida a través de controles secuenciales usando técnicas moleculares (pcr y pcr sobre colonias) usando los cebadores específicos correspondientes.

#### *4.3.1.1. Análisis de secuencias*

Los vectores de entrada pDONR™221 con los constructos correspondientes fueron secuenciados utilizando el servicio de Macrogen Korea y los cebadores empleados fueron M13F (-20) y M13R pUC (-40), incluidos en el vector. El análisis de la secuencia obtenida se realizó con el programa EditSeq-DNASTAR 4.05. Las secuencias de nucleótidos y las correspondientes secuencias de aminoácidos se compararon utilizando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul y col., 1997) y la base de datos disponibles en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 4.3.2. Transformación en *E. coli* (pLys) y expresión heteróloga

#### 4.3.2.1. Generación de células competentes

Para lograr sobreexpresar las proteínas en cuestión, en primer lugar, se debieron realizar células competentes de *E. coli* BL21 (pLys). Para ello, se tomó un stock en glicerol de la cepa de *E. coli* de interés (BL21 (pLys)) y se realizó un aislamiento en placa con el antibiótico en cuestión (cloranfenicol). De dicho aislamiento se seleccionó una colonia y se inició un cultivo líquido de 3 mL en medio LB con el antibiótico y se lo dejó toda la noche (ON) a 37 °C en agitación. Luego de este cultivo ON, se realizó una dilución 1:100 en medio líquido LB (500 µl de cultivo crecido en 50 mL finales) y se cultivó nuevamente (sin antibiótico) a 37 °C hasta una DO (densidad óptica) de 0,450-0,550 a 600 nm. Una vez que el cultivo alcanzó la DO mencionada, se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El pellet se resuspendió en 20 mL de solución *Tfbl* (KAc [acetato de potasio] 30 mM; KCl 100 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 50 mM; Glicerol 15% v/v) fría (4 °C) y se dejó reposar la suspensión 5 minutos en hielo. Luego, se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El pellet se resuspendió en 2 mL de solución *Tfbl* (MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico] 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM; KCl 10 mM; Glicerol 15% v/v) y se dejó reposar en hielo durante 15 minutos (Fracción que contiene las células competentes). Por último, dicha suspensión se fraccionó de a 110 uL en tubos eppendorf estériles. Dichas células competentes pueden ser realizadas y almacenadas a -80 °C durante meses hasta su uso.

#### 4.3.2.2. Transformación de las células competentes

Las construcciones, correspondientes a cada uno de los insertos en el vector de destino, pDEST™17, se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* BL21 (pLys). Para ello, a las células competentes se le agregó 1 µL del constructo de interés y se las dejó reposar durante 15 min en hielo. Posteriormente, se colocaron en un baño de agua a 42 °C durante 45 s (shock térmico) para luego dejarlas reposar en hielo nuevamente durante 10 min. Por último, a las células competentes se les adicionaron 750 µL de medio LB y 75 µL de glucosa 2M (etapa de recuperación de las células competentes). Por último, se sembraron en placas y se dejaron crecer durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes (ampicilina (100 mg mL<sup>-1</sup>), resistencia del vector de destino; cloranfenicol (30 mg mL<sup>-1</sup>), resistencia de *E. coli* BL21 (pLys)).

#### 4.3.2.3. Expresión heteróloga

Se eligieron colonias de células transformadas, se tomaron muestras con palillos estériles y se hicieron cultivos iniciales de 5 mL de medio LB suplementado con antibióticos (ampicilina y cloranfenicol) a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche. Por último, se realizó una dilución 1:100 en medio líquido LB (1 mL de cultivo crecido en 100 mL finales) suplementado con ampicilina y cloranfenicol, con agitación (200 rpm) a 37 °C hasta DO 0,5 a 600 nm. Una vez alcanzada dicha DO, se añadió IPTG (1 mM de concentración final) para inducir la expresión de la proteína en la misma condición de cultivo durante 4 h. Las células se recogieron por centrifugación a 8000 x g durante 10 min a 4 °C, y el sedimento de los 100 mL de cultivo, se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Para la construcción de las curvas de inducción se colectaron muestras de 1 mL a las 0 h, 2 h, 4 h y 6 h. Dichas muestras se centrifugaron durante 2 min a 10.000 rpm y se almacenaron a -20 °C para su posterior evaluación mediante SDS-PAGE.

#### **4.3.3. Purificación de las proteínas recombinantes**

El sedimento celular de 100 mL de cultivo inducido durante 4 h (véase, sección 4.3.2), se resuspendió en un buffer H ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,0 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,4 mM, NaCl 286,0 mM, KCl 2,6 mM, pH 7,4) suplementado con los siguientes reactivos a concentraciones finales de: PMSF [fluoruro de fenilmetilsulfonilo] 2 mM, DTT [1,4-ditiotreitol] 0,1 mM y EDTA [ácido etilendiaminotetraacético] 5 mM, en una relación de 30 mL de buffer por 1 g de sedimento húmedo. La suspensión se incubó en hielo durante 30 min y después se sometió a 5 ciclos de sonicación en hielo (30 s de sonicación, 45 s de descanso), haciendo uso de un sonicador (Sonics® Vibra-Cell VCX130 PB) a 30% de amplitud. El lisado se centrifugó a 10.000 x g y 4 °C durante 20 min. Los agregados de proteínas recuperadas en el sedimento se desnaturalizaron con buffer I (buffer H con SDS [dodecil sulfato de sodio]) 1% p/v) y se purificó adicionalmente por cromatografía de afinidad de níquel (CANI) en condiciones desnaturalizantes, siguiendo el protocolo descrito por Schlager y col. (2012), con modificaciones menores.

La cromatografía se realizó utilizando un cromatógrafo Äkta Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences) con una columna de 1 mL HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences). Como buffer de lavado y de equilibrado se empleó el buffer J (buffer H suplementado con sarcosil [sal de sodio de N-dodecanoil-N-metilglicina] 0,1% p/v)

mientras que como buffer de elución se utilizó buffer K (buffer J suplementado con imidazol [1,3-diaza-2,4-ciclopentadieno] 500 mM).

La concentración de la proteína eluída purificada se determinó por el método de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

#### **4.3.4. SDS-PAGE e Inmuno-detección**

El proceso de producción y purificación de las proteínas recombinantes de interés fue seguido por SDS-PAGE y por inmuno-detección (Western-blot).

Para los SDS-PAGE se emplearon geles de poliacrilamida 15% (p/v) para el caso del análisis de los dominios de unión a carbohidratos y catalítico putativo, y del 12% (p/v) para el caso de la proteína completa. La electroforesis se realizó utilizando el sistema de buffers (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; SDS 0,1% p/v pH: 8,8) descrito por Laemmli (1970), en un equipo de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad), con un voltaje de 80 V constante durante la corrida del gel de apilamiento y luego de 120 V constante hasta concluir la corrida. Los geles se tiñeron con nitrato de plata según Blum y col. (1987), o con una solución de Coomassie Brilliant Blue (G250, Sigma-Aldrich®) al 0,1% p/v durante 2 h y luego fueron desteñidos con solución decolorante (metanol 40% v/v y ácido acético 10% v/v).

Para el caso de la inmuno detección, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham), utilizando el equipo Mini-PROTEAN mencionado y un buffer de transferencia (Tris 25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20% v/v; pH: 8,8). La detección de las proteínas se hizo mediante un anticuerpo contra la



etiqueta de poli-histidinas presente (Penta-His™, QIAGEN) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El revelado por quimio luminiscencia, se realizó con un reactivo de ECL que consta de dos soluciones: solución 1 (4,592 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>; 333 µL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 25 µL de ácido p-cumárico 15 mg mL<sup>-1</sup> en DMSO 90 mM; 50 µL Luminol 44 mg mL<sup>-1</sup> en DMSO 250 mM); solución 2 (4,662 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>; 333 µL Tris-HCl 1,5 M pH: 8,8; 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % v/v). Una vez generadas ambas soluciones se mezclaron y la membrana se dejó en contacto con agitación durante 2 min. Por último, el revelado de la placa se realizó con un lector de quimio luminiscencia c-Digit (LI-COR Biosciences), con un tiempo de exposición de 12 min.

#### **4.3.5. Ensayo de replegado de las proteínas recombinantes**

Para lograr establecer la mejor condición de replegado de cada una de las proteínas analizadas, se utilizaron dos técnicas convencionales: cambio de buffer por diálisis y cambio de buffer por dilución rápida (*del inglés*: flash dilution).

En el caso del replegado de las proteínas mediante diálisis, las fracciones purificadas por cromatografía fueron primero diluidas hasta una concentración final de 50 µg mL<sup>-1</sup> en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, urea 8,0 M (para liberar el sarkosil y restos de SDS). Luego, las proteínas se dializaron utilizando bolsas con un tamaño de corte de 14 kDa (Sigma-Aldrich®), contra diversos buffers, a 4° C con agitación. Finalizada la diálisis, la solución obtenida se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. El contenido de proteínas en el sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford (1976).

Para el caso del método de la dilución rápida, la fracción proteica purificada de la cromatografía se cuantificó y luego se diluyó rápidamente con el buffer de elección

hasta una concentración final de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Luego se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12.000 rpm por 2 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford (1976).

#### **4.3.6. Ensayo de estabilización de las proteínas recombinantes**

Para el caso de la estabilización de las proteínas con el uso de diversos agentes estabilizantes, la técnica empleada para ello fue la de dilución rápida de cada una de ellas, hasta alcanzar una concentración final de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . La mezcla de estabilización usada fue de 500  $\mu\text{L}$ , donde los distintos agentes de estabilización (preparados a una concentración 10 X) fueron ensayados a diferentes concentraciones en un buffer específico con el objeto de obtener curvas de estabilización en función de las diferentes concentraciones de los agentes estabilizantes empleados. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente con agitación en un agitador pivotante por un lapso de 30 min. Luego de ello, se centrifugaron las soluciones a 12.000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Por último, el contenido de proteína en el sobrenadante se cuantificó por el método de Bradford (1976).

Los agentes estabilizantes ensayados fueron: el ácido poligalacturónico (APG), ácido poligalacturónico hidrolizado (APGh), carboximetilcelulosa (CMC), ácido desoxirribonucleico de esperma de salmón (ADN) (Sigma-Aldrich®) y urea (Figura 4.1.). Los agentes estabilizantes ADN, CMC y APGh fueron ensayados en un buffer HAc/Ac 20 mM, pH 4,5; mientras que APG se ensayó en dos buffers distintos: HAc/Ac 20 mM, pH 4,5 y HAc/Ac 20 mM, pH 6,0. En el caso de la urea el ensayo se realizó un buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0.



**Figura 4.1. Representación esquemática del ensayo de estabilización.**

Se pone en contacto cada una de las proteínas en una concentración de 50 µg mL<sup>-1</sup> con los diferentes agentes estabilizantes empleados. Ácido poligalacturónico (APG); ácido poligalacturónico hidrolizado (APGh); carboximetilcelulosa (CMC); ácido desoxirribonucleico de esperma de salmón (ADN); urea.

La hidrólisis química del ácido poligalacturónico se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Díaz y col., (2007) con el objetivo de obtener fracciones hidrolizadas con polímeros de distintos tamaños. Una solución de APG al 1% (p/v), en buffer (HAc/Ac 20 mM pH 4,5) se calentó a 95 °C por 1, 2, 3, 4 y 5 h. A cada tiempo, se extrajeron muestras hidrolizadas que se enfriaron en hielo y guardaron a 4 °C hasta el momento de su uso. Para la estimación del grado de hidrólisis se determinó el contenido en azúcares reductores de cada muestra. La determinación se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por Díaz y col., (2007); se tomaron 100 µL de cada muestra y se les agregó 100 µL de reactivo de cobre (NaCl 23,3 % p/v, acetato de sodio 5,4% p/v, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,5 % p/v, pH 4,8). Se incubaron las muestras a 100 °C durante 15 min, y luego de esperar que las mismas estén frías, se agregaron 0,8 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido en agua destilada 1:40). Por último, se midió la absorbancia a 750 nm. Se construyó una curva de calibración usando ácido galacturónico (AG)

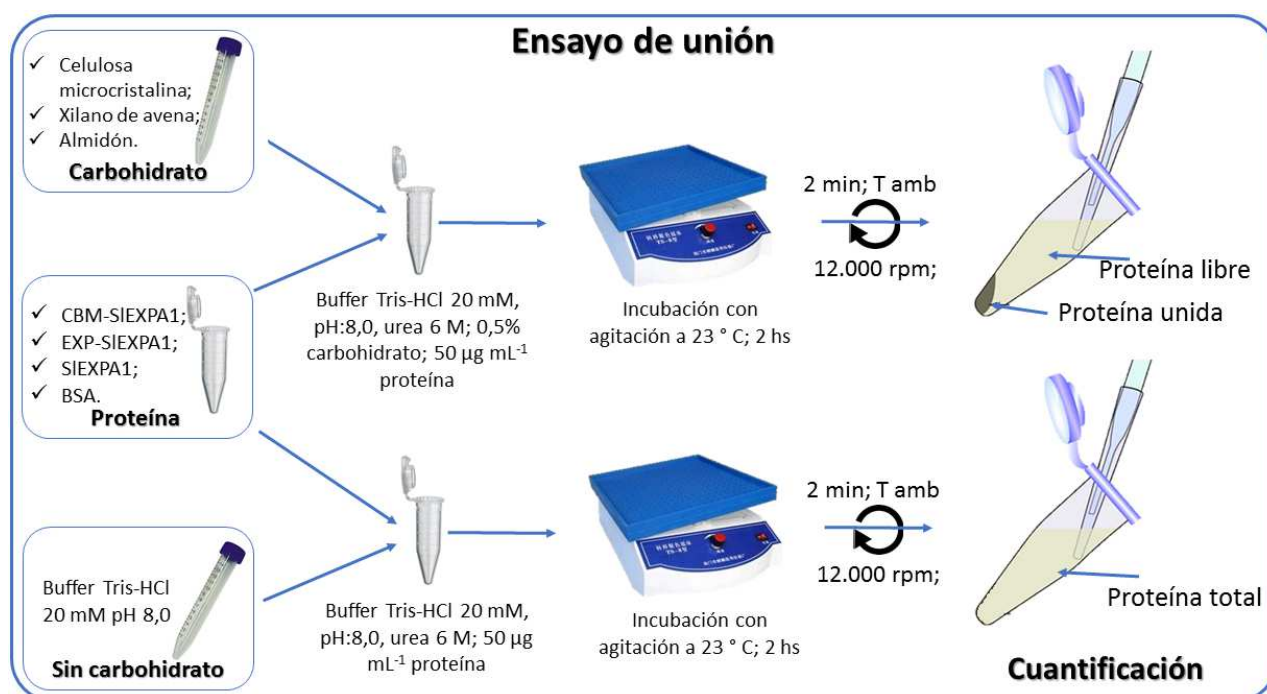
como patrón de referencia. El contenido de azúcares reductores de cada muestra se expresó como nmol de AG por  $\mu\text{L}$ .

#### **4.3.7. Ensayos de unión**

Se evaluó la afinidad de las proteínas CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1 recombinantes frente a diferentes polisacáridos de acuerdo con Sin y col. (2016), con algunas modificaciones. Los polisacáridos que se utilizaron como sustratos fueron: celulosa microcristalina, xilano de avena y almidón (control de no-afinidad). Todos los sustratos se lavaron previamente y se equilibraron con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0 antes de su uso.

Para evaluar la afinidad de las proteínas por los diferentes sustratos seleccionados, las diferentes proteínas recombinantes, previamente obtenidas y cuantificadas, se enfrentaron a 2,5 mg de sustrato en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  (buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Las mezclas de reacción contuvieron el volumen de proteínas necesario para que, en la mezcla final de reacción, hubieran 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína; 50  $\mu\text{L}$  de cada sustrato preparado en una concentración 10X y el volumen restante de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 hasta alcanzar los 500  $\mu\text{L}$ . Las mezclas se incubaron durante 2 h a 23 °C con agitación suave (agitador pivotante), y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. La proteína libre (PL) se determinó en el sobrenadante y la proteína unida (PU) se calculó restando la proteína libre a la proteína total (PT) presente. Para determinar la proteína total, el experimento se repitió en paralelo sin el agregado de los hidratos de carbono (Figura 4.2). En este caso la mezcla de reacción no contenía el carbohidrato, en su lugar se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de

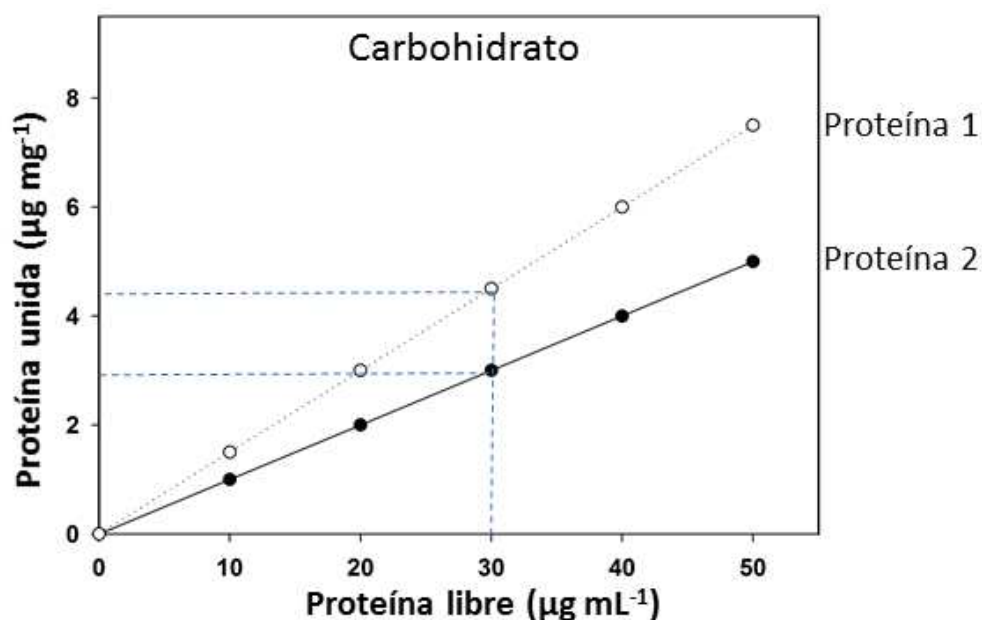
buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Como control de no-unión se empleó BSA (Albumina de suero bovino). Se realizaron 3 ensayos independientes, y cada ensayo se realizó por triplicado.



**Figura 4.2. Representación esquemática del ensayo de unión realizado.**

Se puso en contacto cada una de las proteínas en una concentración de 50 µg mL<sup>-1</sup> con los diferentes sustratos ensayados. La proteína unida se determinó como la diferencia entre la proteína total y la proteína libre.

Se graficaron los datos de la proteína unida por masa de carbohidrato (µg mg<sup>-1</sup>) versus la proteína libre (µg mL<sup>-1</sup>). Dado que se observó un comportamiento lineal, y a fines de poder comparar la capacidad de unión entre las distintas proteínas al mismo carbohidrato, y de una proteína dada frente a los diferentes carbohidratos, los datos fueron normalizados (Figura 4.3). Para ello, se calculó la proteína unida por masa de carbohidrato correspondiente a una cantidad elegida arbitrariamente (30 µg mL<sup>-1</sup>) de proteína libre.



**Figura 4.3. Representación esquemática de una isoterma de adsorción teórica para un carbohidrato y dos proteínas.**

Para cada una de las proteínas ensayadas se determinó la proteína libre y unida (proteína total menos proteína libre) y se calcularon los valores de proteína unida para  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína libre. (Ejemplo: la proteína 1 tiene una mayor afinidad que la proteína 2 para este carbohidrato).

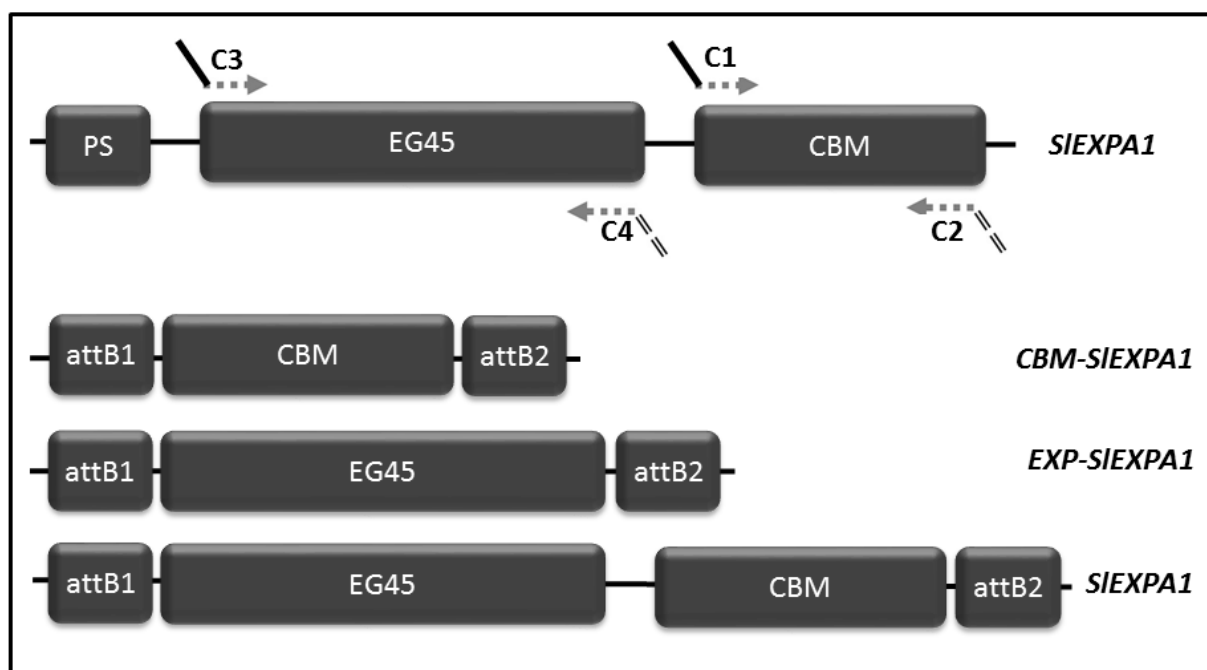
#### 4.3.8. Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de estabilización y de los ensayos de unión se analizaron por ANOVA, mientras que las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Clonado y expresión de CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1

Para el clonado de las tres proteínas, se utilizó la secuencia de *SIEXPA1* completa como molde para generar el amplicón correspondiente al Módulo de Unión a Carbohidratos (*CBM-SIEXPA1*), al dominio catalítico putativo (*EXP-SIEXPA1*) y la proteína completa (*SIEXPA1*). La Figura 4.4 muestra un esquema de la organización modular de *SIEXPA1* identificada utilizando el programa PROSITE (Sigrist y col., 2013), y también la posición de los cebadores utilizados para la generación de los constructos.

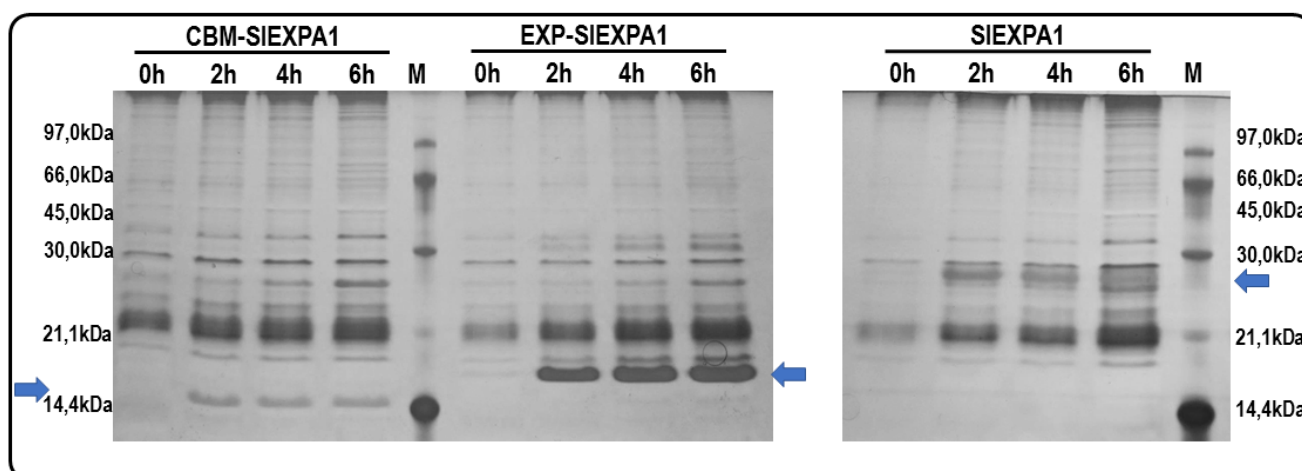


**Figura 4.4. Representación esquemática de la secuencia completa de SIEXPA1 y los cebadores empleados.**

Péptido señal (PS); Dominio catalítico putativo (EG45, EXP); Dominio de unión a carbohidratos (CBM). Las flechas indican la posición de pegado de los cebadores usados para generar cada construcción. Las líneas llenas (—) o entrecortadas (==) indican los sitios de recombinación attB1 y attB2, respectivamente. Cebadores usados para obtener al *CBM-SIEXPA1*: Cebador 1 (C1): sitio de recombinación attB1 y secuencia complementaria del CBM. Cebador 2 (C2): secuencia complementaria del CBM y sitio de recombinación attB2. Cebadores usados para obtener al *EXP-SIEXPA1*: Cebador 3 (C3): sitio de recombinación attB1 y secuencia complementaria del dominio expansina. Cebador 4 (C4): sitio de recombinación attB2 y secuencia complementaria del dominio expansina. Cebadores usados para obtener *SIEXPA1*: Cebador 3 (C3) y Cebador 2 (C2).

Para el caso del dominio CBM se generó un amplicón de 353 pb, para el dominio catalítico putativo de 452 pb y para la proteína completa de 714 pb, conteniendo en cada caso los sitios de recombinación attb1 y attb2 en sus extremos 5' y 3', respectivamente para su posterior recombinación. Cada inserto se recombinó primero en el vector de entrada pDNOR™221 (Invitrogen), y luego en el vector de destino pDEST™17. Estos plásmidos (*CBM-SIEXPA1-pDEST™17*; *EXP-SIEXPA1-pDEST™17*; *SIEXPA1-pDEST™17*) fueron utilizados para transformar células de expresión de *E. coli* BL21 (DE3)-pLys (véase, sección 4.3.2).

Con las células de expresión transformadas con cada vector, en primer lugar, se realizó un análisis para determinar el tiempo óptimo de inducción de las proteínas recombinantes. Para ello, se indujeron células transformadas, se tomaron alícuotas del cultivo después de 0, 2, 4, y 6 h y se analizó el perfil de proteínas mediante SDS-PAGE (Figura 4.5).



**Figura 4.5. Perfil de proteínas (SDS-PAGE) de *E. coli* sobrepresantes de CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1, a distintos tiempos post-inducción.**

Análisis de alícuotas de cultivos de *E. coli* transformadas, después de 0, 2, 4 y 6 h post-inducción. M: Marcador de peso molecular (14,1-97,0 kDa). Los gels fueron teñidos mediante la tinción con nitrato de plata.

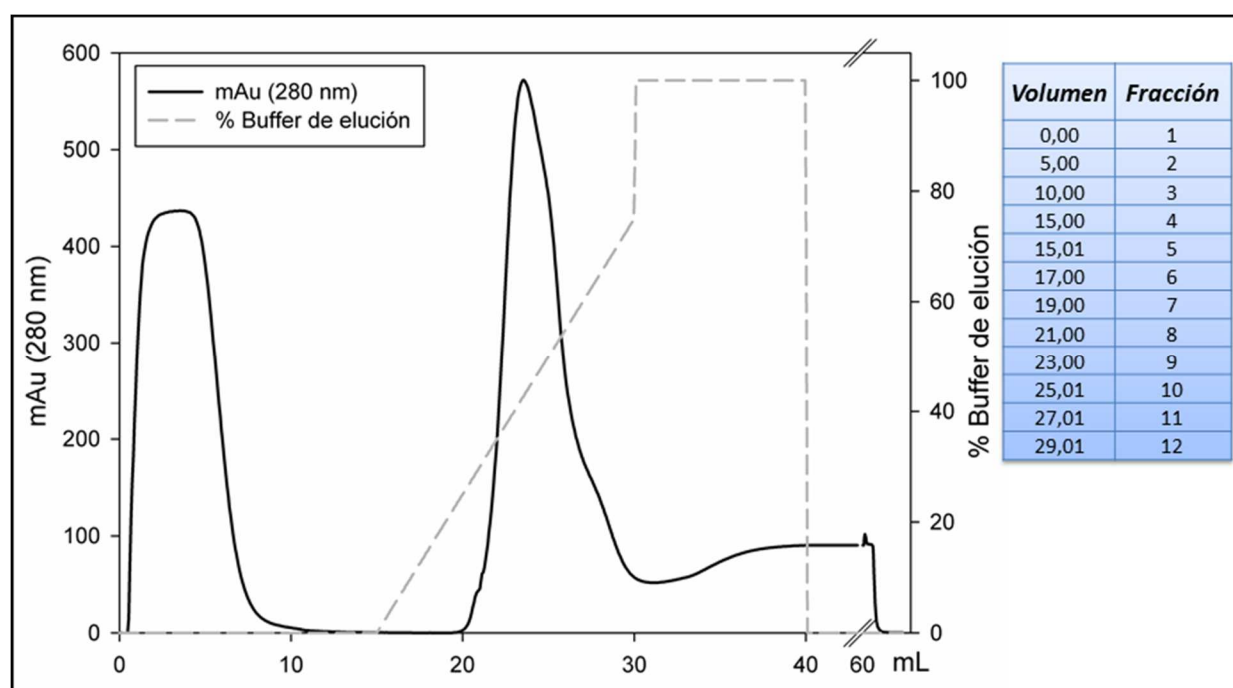


En los tres casos, se eligió un tiempo de inducción de 4 h. También se verificó si la producción de las proteínas se encontraba en la fracción insoluble o en el sobrenadante. En ningún caso se observó la presencia de las proteínas en el sobrenadante, mientras que sí se observó sobreexpresión en la fracción insoluble.

#### **4.4.2. Purificación de CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1**

Una vez obtenidas las bacterias de expresión, y puestos a punto los tiempos de inducción, se procedió a la producción y purificación de las proteínas recombinantes a partir de los cuerpos de inclusión. Para ello, en primera instancia se realizó la ruptura de las células mediante sonicación en un buffer de lisis, tal como se describe en la sección 4.3.3. De este paso se obtuvo una fracción soluble y los cuerpos de inclusión purificados. Luego, se procedió a la ruptura de los cuerpos utilizando un buffer con SDS tal como lo describe Schlager y col. (2012). Esta fracción solubilizada de cuerpos desnaturalizados fue posteriormente purificada mediante cromatografía de afinidad a níquel (Figura 4.6).

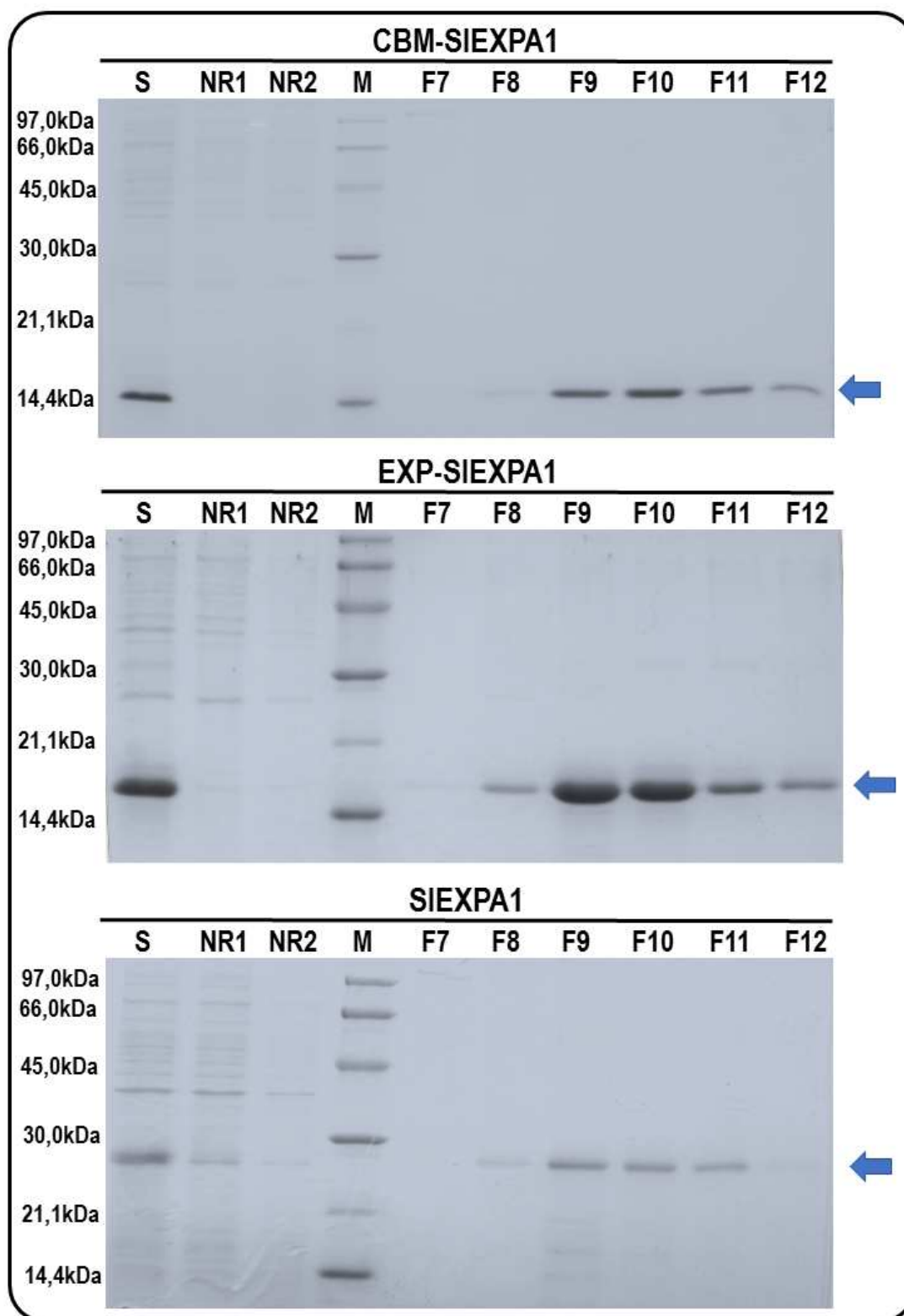
Por último, se colectaron las fracciones de la corrida y se verificó la pureza de las eluciones a través de un gel desnaturalizante de poliacrilamida. (Figura 4.7.). En el caso de las tres proteínas analizadas, se observó que las mismas fueron retenidas en la columna y eluídas posteriormente con el pasaje de un gradiente de imidazol. Las proteínas comenzaron a ser detectadas en la fracción 7 del eluato y terminaron entre la fracción 11-12, siendo el punto más alto en la fracción 9 donde el porcentaje aproximado de buffer de elución es del 40%.



**Figura 4.6. Cromatograma representativo de la purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad al níquel (CANI).**

La curva de línea continua representa la absorbancia a 280 nm. La curva punteada en gris indica el gradiente de cromatografía de elución (% de buffer de elución). El buffer de lavado y equilibrio:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,0 mM;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,4 mM; NaCl 286 mM; KCl 2,6 mM; sarcosil 0,1% p/v, pH 7,4. Buffer de elución: buffer de lavado suplementado con imidazol 500 mM. (Este cromatograma fue obtenido en la purificación de la proteína EXP-SIEXPA1).

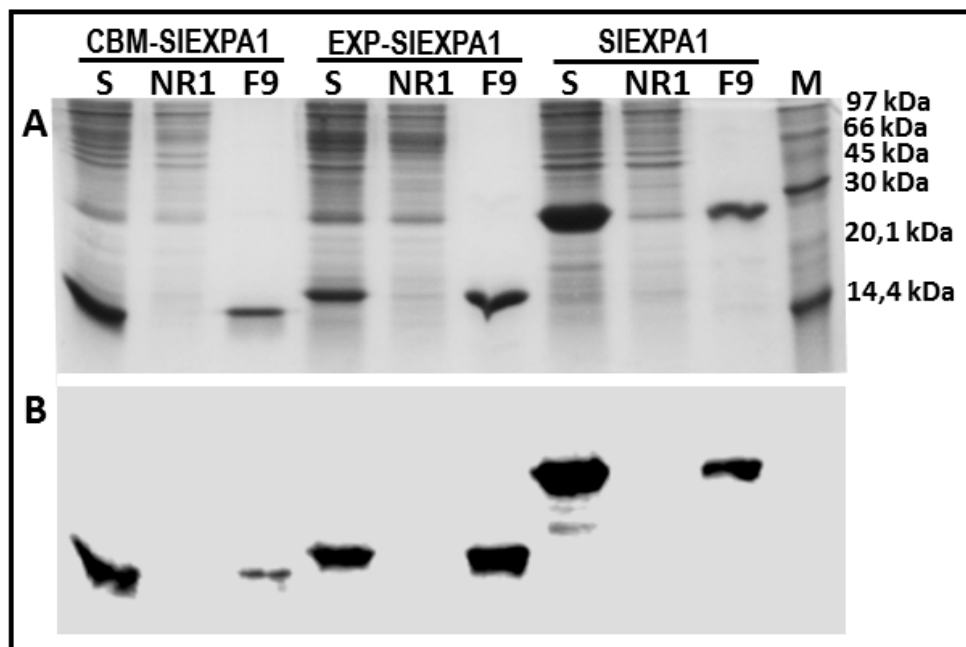
El análisis por SDS-PAGE indica que se han podido purificar las proteínas y que sus pesos en relación a los marcadores de peso molecular usados son similares a los predichos *in silico*. Los pesos teóricos predichos son: 13,4 kDa para CBM-SIEXPA1; 16,03 kDa para EXP-SIEXPA1 y 26,78 kDa para SIEXPA1 (Figura 4.7).



**Figura 4.7. SDS-PAGE de fracciones obtenidas en la purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad al Níquel.**

Purificación de CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1. Siembra (S); Fracciones no retenidas: NR1; NR2; Marcador de peso molecular (14,1-97,0 KDa) (M); Fracciones retenidas, eluidas en el gradiente de imidazol: F7; F8; F9; F10; F11; F12. Los geles fueron teñidos con Coomassie-Blue G-250.

Para verificar la pureza de las proteínas obtenidas, se realizó un ensayo de inmuno-detección usando un anticuerpo contra la etiqueta de poli-histidina (Figura 4.8).



**Figura 4.8. Análisis mediante inmuno-detección de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad al níquel.**

**A)-** Gel de poliacrilamida 15%, teñido con Coomassie-Blue G-250. **B)-** Inmuno-detección con anticuerpos contra la etiqueta de poli-histidina. Membrana de nitro celulosa revelada por quimioluminiscencia. Fracciones correspondientes a la purificación de CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1. Siembra (S); Fracción del no retenido 1 (NR1); Fracción 9 del eluido (F9); Marcador de peso molecular (14,1-97,0 KDa) (M).

Los resultados del inmuno-ensayo confirmaron la presencia de las tres proteínas en la fracción retenida, y posteriormente eluída con imidazol. En los tres casos se observó una sola banda, correspondiente a las masas moleculares esperadas, lo cual sugiere que no se produjo degradación proteolítica en las proteínas purificadas. En base a estos resultados, las proteínas purificadas presentes en la fracción 9 del eluato fueron utilizadas para los ensayos posteriores de afinidad a sustratos.

#### 4.4.3. Ensayo de replegado de las proteínas en diferentes condiciones

A fines de eliminar el imidazol y el sarkosil presentes en los extractos, y favorecer el replegado de las proteínas en cuestión, tal como se comentó en la sección 4.3.4, se usaron básicamente dos técnicas convencionales: cambio de buffer por diálisis y cambio de buffer por dilución rápida (del inglés: *flash dilution*). La concentración de proteínas empleada fue de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esta elección no fue arbitraria, dado que existen evidencias que las concentraciones de proteínas bajas favorecen el replegado (Eiberle y Jungbauer, 2010; Gautam y col., 2012). Las concentraciones usualmente utilizadas están entre  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nuestra elección de utilizar una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  se debió a la limitación en la sensibilidad del método de cuantificación de proteínas empleado.

Para el caso de la diálisis, los intentos para el replegamiento de las proteínas purificadas se hicieron a partir de la dilución de las fracciones de elución (F9) a una concentración de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteína en un buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, urea 8,0 M. La incorporación de urea se hizo con el objeto de liberar a la proteína de restos de sarkosil o SDS unidos; el proceso se completó con la diálisis de la solución para eliminar todos los agentes de desnaturalización presentes. En esta etapa de diálisis, se ensayaron diferentes tipos de buffer a diferentes pH (4,5 a 8,0) y fuerzas iónicas (5 mM a 500 mM). Además, se ensayó el agregado de NaCl, en concentraciones finales de 10-250 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol y DTT 2 mM como agentes reductores, y glicerol (30% v/v) para incrementar la viscosidad de las soluciones (Tabla 4.1). En todos los casos la recuperación de la proteína fue muy baja, por lo cual se decidió cambiar el método para inducir el replegado de las proteínas.

**Tabla 4.1:** Diferentes condiciones de buffer empleadas en el proceso de replegado por diálisis.

<i>Condición inicial</i>	Fracción 9. Proteína (C= 400-600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en 40 % Buffer J ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 8,0 mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1,4 mM, NaCl 286,0 mM, KCl 2,6 mM; sarkosil 0,1 %p/v; Imidazol 200 mM; pH 7,4).
<i>Etapas de dilución</i>	Proteína (C= 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) en Buffer Tris-HCl 20 mM; pH 8,0; urea 8M.
<i>Etapas de diálisis</i> (4°C, toda la noche en agitación suave)	✓ Buffer Tris-HCl 5 mM; pH 8,0;
	✓ Buffer Tris-HCl 20 mM; pH 8,0;
	✓ Buffer Tris-HCl 20 mM; pH 8,0; Glicerol 30 % v/v; $\beta$ -mercaptoetanol o DTT 2 mM;
	✓ Buffer Tris-HCl 50 mM; pH 8,0;
	✓ Buffer Tris-HCl 100 mM; pH 8,0;
	✓ Buffer Tris-HCl 500 mM; pH 8,0;
	✓ Buffer Tris-HCl 20 mM; pH 8,0; NaCl 10 mM;
	✓ Buffer Tris-HCl 20 mM; pH 8,0; NaCl 250 mM;
	✓ Buffer HAc/Ac 5 mM pH 4,5
	✓ Buffer HAc/Ac 20 mM pH 4,5
	✓ Buffer HAc/Ac 20 mM pH 4,5; Glicerol 30 % v/v; $\beta$ -mercaptoetanol o DTT 2 mM;
	✓ Buffer HAc/Ac 100 mM pH 4,5
	✓ Buffer HAc/Ac 500 mM pH 4,5
	✓ Buffer HAc/Ac 50 mM pH 6,0
	✓ Buffer G ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 8,0 mM, $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 1,4 mM, NaCl 286,0 mM, KCl 2,6 mM; pH 7,4)

Se eligió la dilución directa como técnica de replegado de proteínas para este ensayo por su simpleza y rapidez (Eiberle y Jungbauer, 2010; Gautam y col., 2012). En este caso, las proteínas de la fracción eluída empleada (Fracción 9;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,0 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,4 mM, NaCl 286,0 mM, KCl 2,6 mM; sarkosil 0,1 %p/v; Imidazol 200 mM; pH 7,4,  $C_{\text{proteína}} = 400-600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), fueron diluidas directamente a una concentración final de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el buffer seleccionado. El hecho que el sarkosil se diluya casi 10 veces nos garantiza que su concentración esté por debajo de 0,03 % p/v que es la concentración a partir de la cual se considera que pierde su capacidad como agente desnaturizante. Se ensayaron nuevamente las condiciones mencionadas para el caso

de la diálisis, y además se ensayó el agregado de otros coadyuvantes que facilitan el replegado proteico. Se probó el agregado de PEG (Polietilenglicol, 5% p/v), sarcosyl (0,03% p/v; concentración no desnaturalizante), Triton X-100 (0,1% v/v: detergente no iónico), entre otros.

Todos los intentos realizados para obtener las proteínas replegadas, tanto por diálisis como por dilución directa, fueron infructuosos, provocando la agregación de las proteínas y su precipitación en el paso de centrifugación previo a la cuantificación.

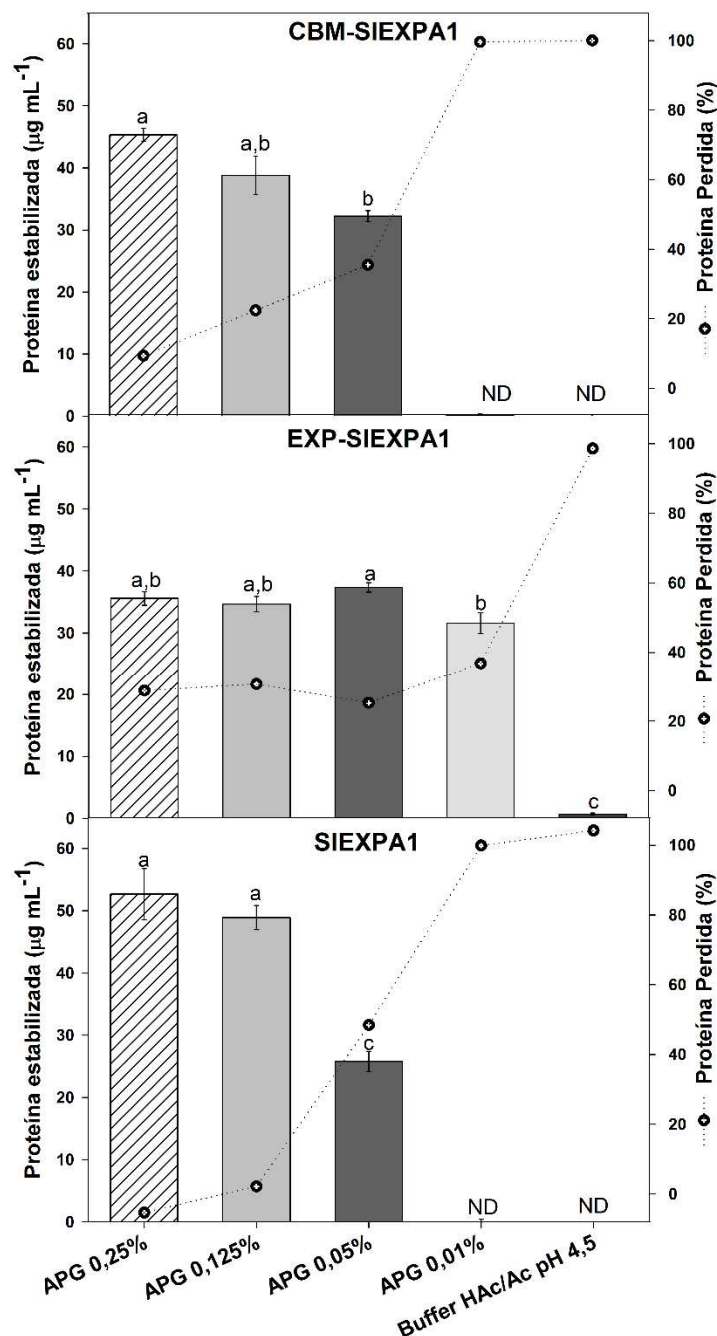
#### ***4.4.4. Ensayos de estabilización de las proteínas con diferentes agentes estabilizantes***

Dada la dificultad para obtener las proteínas en su forma replegada, como se describió en la sección anterior, se decidió ensayar el agregado de distintos agentes estabilizantes, algunos de ellos previamente descriptos en la bibliografía. Para evidenciar el comportamiento de las proteínas frente a estos agentes, se empleó la técnica por dilución rápida. En todos los casos, el material de partida fue la proteína en estudio, purificada como se describió previamente (Fracción 9;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,0 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,4 mM, NaCl 286,0 mM, KCl 2,6 mM; sarkosil 0,1 %p/v; Imidazol 200 mM; pH 7,4,  $C_{\text{proteína}} = 400\text{-}600 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), llevándose a una concentración final durante el ensayo de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  con el agregado del respectivo agente estabilizante.

##### ***4.4.4.1. Ensayo de estabilización con ácido poligalacturónico (APG)***

El uso de este poli-anión en la estabilización de proteínas ha sido previamente demostrado (Sin y col., 2016), es por ello que decidimos ensayar si existe alguna condición en la cual el mismo pueda estabilizar a las proteínas en cuestión. En este

caso, cada una de las proteínas fueron enfrentadas a 4 concentraciones de APG a dos pH distintos.



**Figura 4.9. Estabilización de las proteínas con APG en buffer HAc/Ac pH: 4,5.** Análisis de la capacidad de estabilización de APG a diferentes concentraciones (APG 0,25%; APG 0,125%; APG 0,05%; APG 0,01% p/v) sobre: el dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); el dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1) y la expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1). La concentración inicial de proteínas fue igual a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada. Las barras representan a la

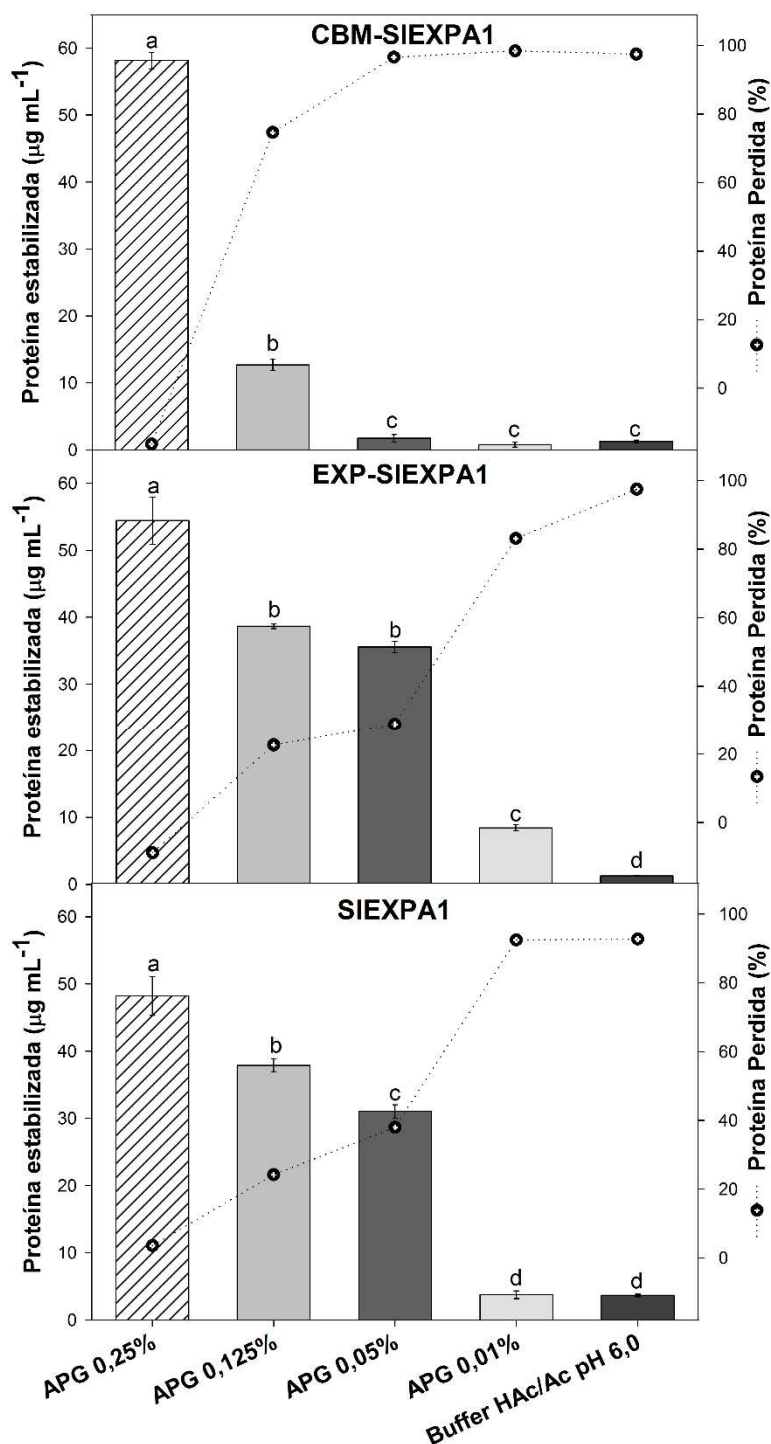


concentración de proteína soluble estabilizada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) luego del proceso de repliegado de la proteína recombinante en cada condición. Los datos corresponden a la proteína soluble estabilizada  $\pm$  ES de tres replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ ; Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

En primer lugar, se ensayó la capacidad de estabilización del APG a 0,5%, 0,125%, 0,05% y 0,01% (p/v) en una solución amortiguadora de HAc/Ac 20 mM, pH 4,5 (Figura 4.9). Para el caso del CBM-SIEXPA1, se observó que aproximadamente el 90% de la proteína inicial permanece estable en presencia de 0,25% (p/v) de APG en la solución. Se detectó además que el porcentaje de proteína estable disminuye a medida que desciende la concentración de APG; sin embargo, el 50% de la proteína permanece estable aún a bajas concentraciones de APG (0,05% p/v).

En el caso del EXP-SIEXPA1, la estabilización por el APG fue menos efectiva que en el caso anterior, observándose valores más bajos de proteína estable, pero menos dependiente de la concentración de APG. Cabe destacar que un 50% de la proteína se estabilizó incluso en la concentración más baja de APG (0,01% m/v) ensayada.

Por último, para el caso de la proteína completa, SIEXPA1, la misma presentó un perfil de estabilización similar al observado para el caso del CBM-SIEXPA1, aunque los valores de recuperación de proteínas fueron ligeramente superiores para el caso de las primeras dos concentraciones de APG (0,25% y 0,125% p/v).



**Figura 4.10. Estabilización de las proteínas con diferentes cantidades de APG en buffer HAc/Ac pH: 6,0.**

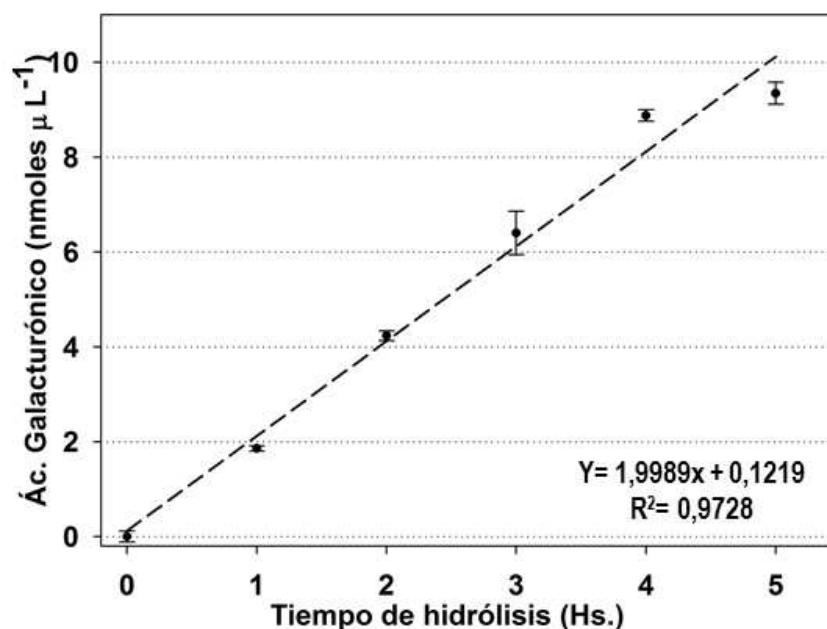
Análisis de la capacidad de estabilización de APG a diferentes concentraciones (APG 0,25%; APG 0,125%; APG 0,05%; APG 0,01% p/v) sobre: el dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); el dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1) y la expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1). La concentración inicial de proteínas fue igual a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada. Las barras representan a la concentración de proteína soluble estabilizada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) luego del proceso de repliegado de la proteína

recombinante en cada condición. Los datos corresponden a la proteína soluble estabilizada  $\pm$  ES de tres replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ ; Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

Se ensayaron, además, las mismas concentraciones de APG como agentes estabilizantes, pero a un pH diferente con el objeto de dilucidar si este proceso de estabilización se veía alterado. Cada una de las proteínas fueron ensayadas en las cuatro concentraciones de APG en un buffer HAc/Ac 20 mM pH 6,0 (Figura 4.10). Para el caso del CBM-SIEXPA1 la estabilización fue alta cuando se utilizó la concentración de 0,25% p/v de APG, mientras que para las concentraciones más bajas de APG el descenso de la proteína estabilizada fue muy marcado. En el caso de la EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1 el perfil de estabilización fue similar. Para la concentración más elevada la estabilización fue casi completa, mientras que para las dos concentraciones consiguientes el porcentaje de estabilización fluctuó en el rango de 50-60%.

Para determinar si el tamaño del APG está involucrado en el fenómeno de estabilización, se decidió someter al polímero a una hidrólisis química por 5 h previo a su uso como agente estabilizante, tomando muestras del hidrolizado cada hora del proceso (fracciones APG1h a APG5h). Para ello, la concentración de APG probada fue de 0,15% en buffer HAc/Ac 20 mM pH 4,5, que es la condición en la cual las tres proteínas tienen un grado de estabilización aceptable.

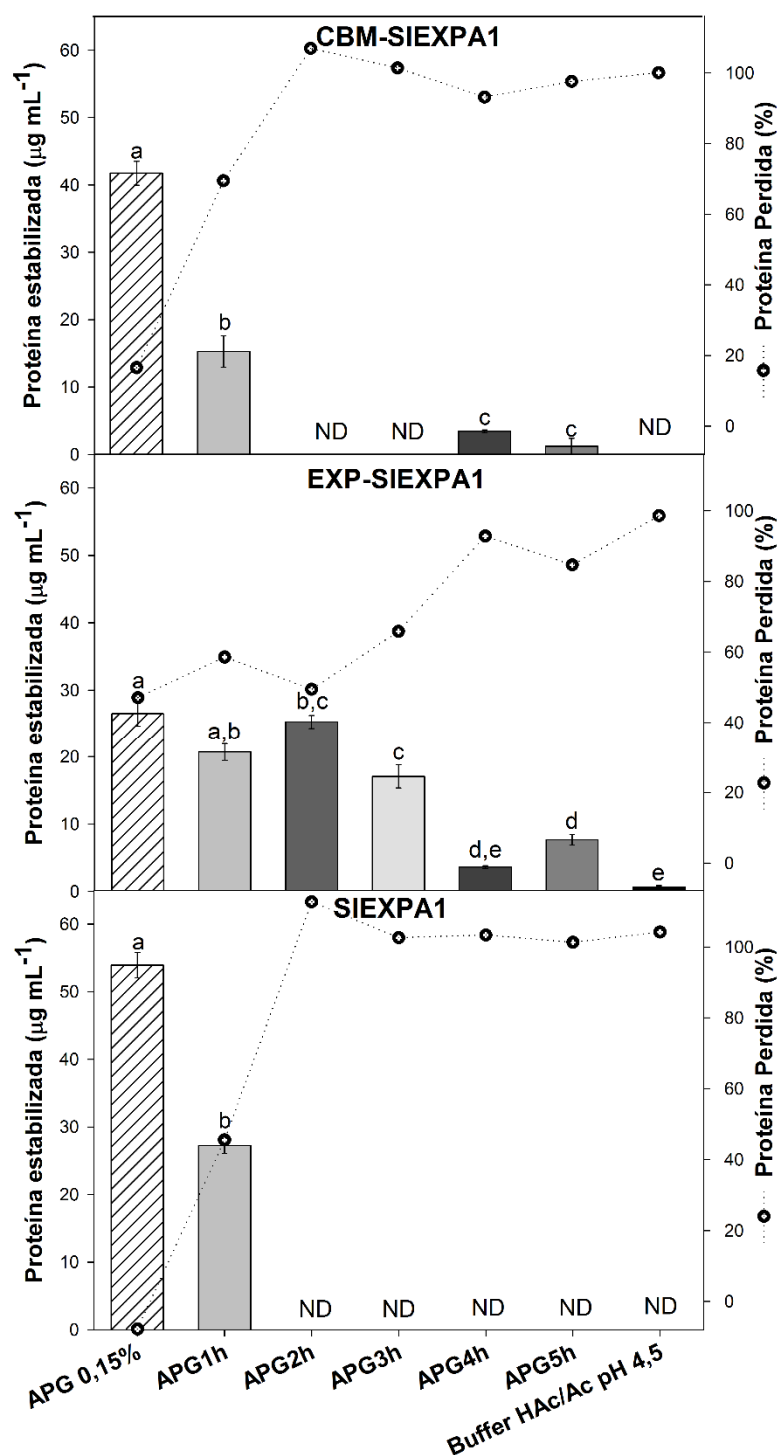
El proceso de hidrólisis se siguió midiendo el contenido de azúcares reductores en cada muestra hidrolizada, graficando los valores expresados como nmol de AG por microlitro ( $\text{nmol } \mu\text{L}^{-1}$ ) versus el tiempo de hidrólisis (Figura 4.11). El proceso mostró una respuesta lineal, indicando aproximadamente la ruptura de dos enlaces por hora ( $y = 1,9989 x + 0,1219$ ).



**Figura 4.11. Curva de hidrólisis de APG.**

La curva de hidrólisis se realizó con APG 1% p/v como se describe en Sin y col. 2016. Las muestras fueron tomadas a 1, 2, 3, 4 y 5 horas de hidrólisis. ( $y = 1,9989 + 0,1219$ ;  $R^2 = 0,9728$ ).

Las cinco fracciones hidrolizadas de APG fueron ensayadas como agentes estabilizantes en buffer HAc/Ac 20 mM pH 4,5 (Figura 4.12). En el caso del CBM-SIEXPA1 y SIEXPA1 la caída en la estabilización se observó a partir del primer hidrolizado (APG1h) observándose pérdidas de proteínas del orden de 50 %, pero la pérdida total de estabilización se observó a partir del segundo hidrolizado (APG2h). Para la EXP-SIEXPA1, si bien la estabilización fue siempre menor, la misma se mantuvo hasta la cuarta fracción hidrolizada (APG3h), posterior a esto los valores de estabilización fueron muy bajos.



**Figura 4.12. Estabilización de las proteínas con hidrolizados de PGA 0,15% p/v en buffer HAc/Ac pH 4,5.**

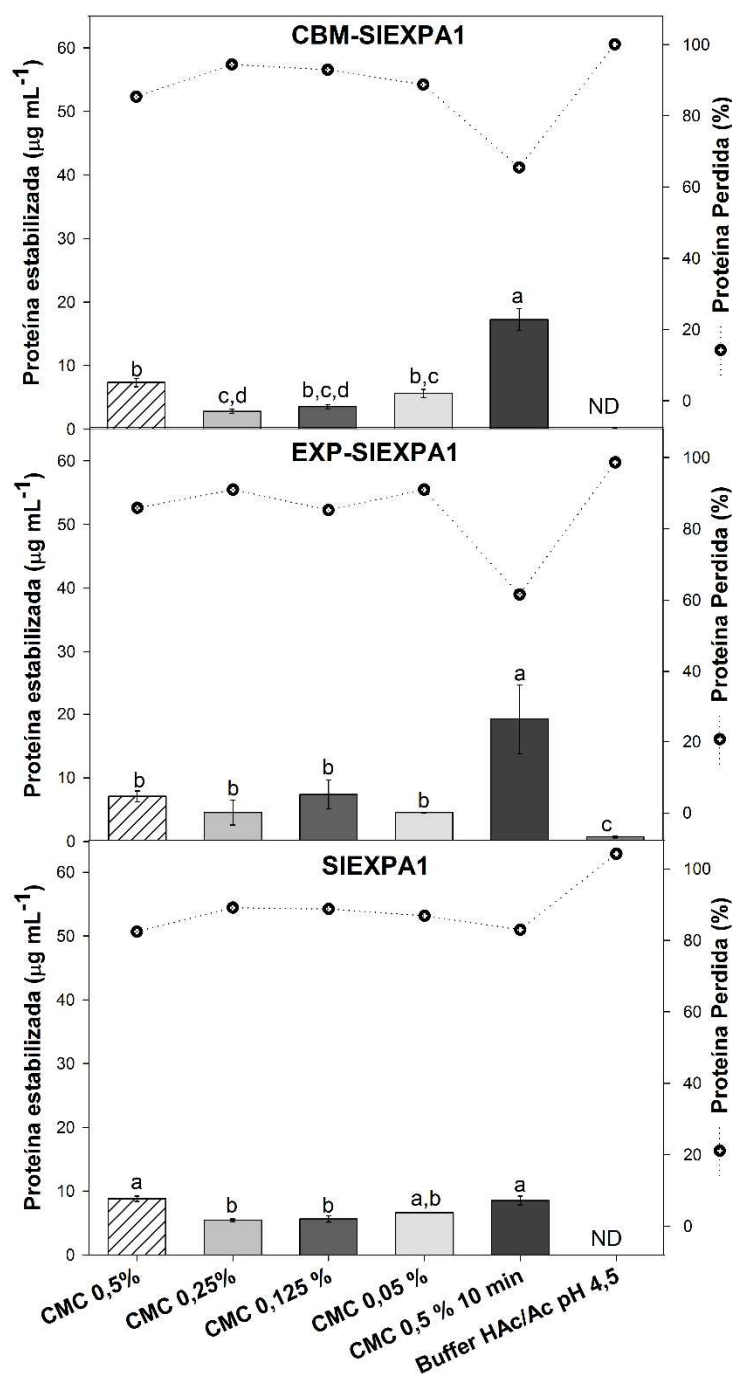
Análisis de la capacidad de estabilización de APG 0,15% y de sus diferentes hidrolizados (APG1h; APG2h; APG3h; APG4h y APG5h) sobre: el dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); el dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1) y la expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1). La concentración inicial de proteínas fue igual a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada. Las barras representan a la

concentración de proteína soluble estabilizada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) luego del proceso de repliegado de la proteína recombinante en cada condición. Los datos corresponden a la proteína soluble estabilizada  $\pm$  ES de tres replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ ; Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

#### *4.4.4.2. Ensayo de estabilización con carboximetilcelulosa (CMC)*

Dado que en estudios previos del grupo de trabajo se demostró que otro CBM de expansina (CBM-FaEXPA2 de frutilla) se une a celulosa (Nardi y col., 2013), se decidió ensayar como posible agente estabilizante a un derivado soluble de la misma, como lo es la carboximetilcelulosa. Este compuesto es un derivado de la celulosa, que tiene unido grupos carboximetilos a algunos grupos -OH presentes en la misma.

Se ensayaron diferentes concentraciones de CMC (0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,05% p/v) en un buffer HAc/Ac 20mM, pH 4,5 (Figura 4.13). No se observó capacidad de la CMC, en las diferentes concentraciones ensayadas, para estabilizar a ninguna de las tres proteínas. Complementariamente, se hicieron ensayos de estabilización por 10 min, en vez de 30 min como en todos los demás ensayos. Los resultados indicaron que, si bien se recuperó una mayor cantidad de proteína, la CMC no resulta ser una alternativa recomendable como agente estabilizante para ninguna de las proteínas ensayadas.



**Figura 4.13. Estabilización de las proteínas con CMC en buffer HAC/Ac, pH 4,5.**

Análisis de la capacidad de estabilización de CMC a diferentes concentraciones (CMC 0,5%; CMC 0,25%; CMC 0,125%; CMC 0,05% p/v) sobre: el dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); el dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1) y la expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1). La concentración inicial de proteínas fue igual a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada. Las barras representan a la concentración de proteína soluble estabilizada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) luego del proceso de replegado de la proteína

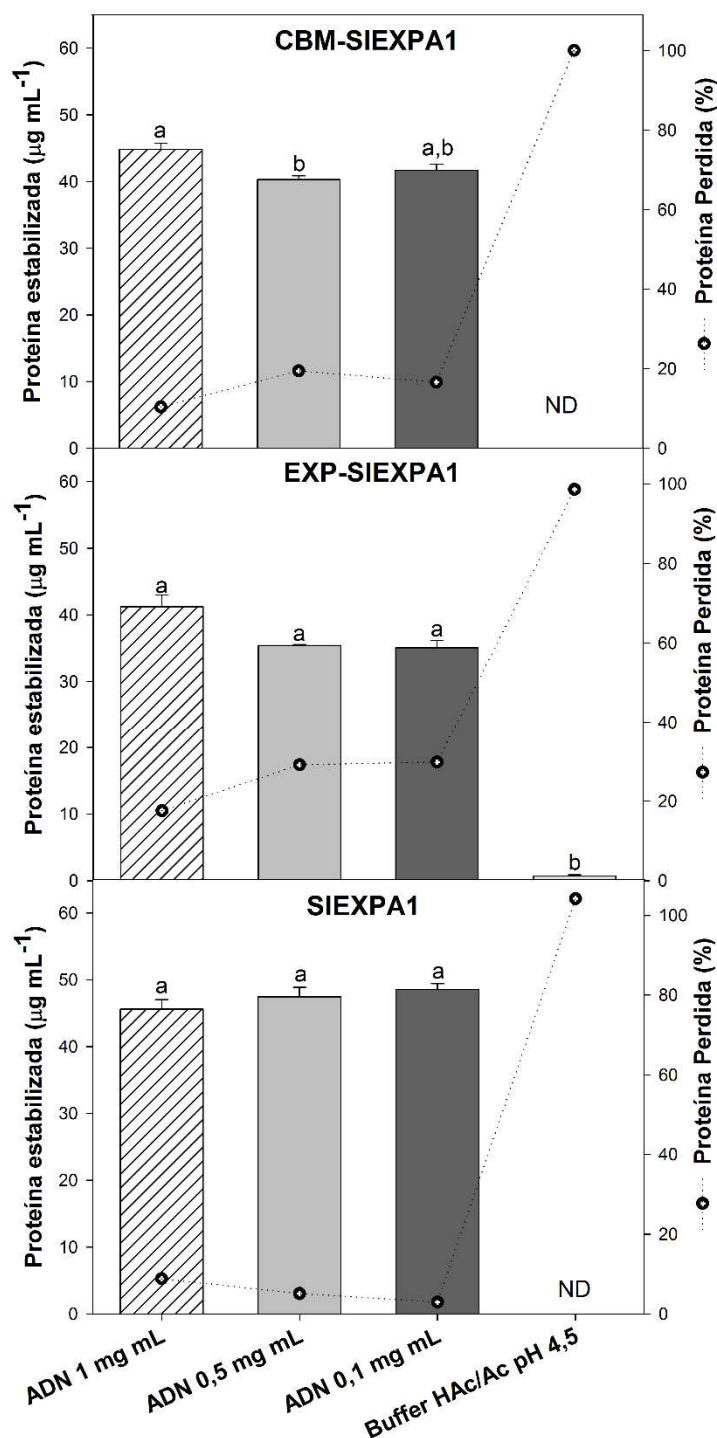
recombinante en cada condición. Los datos corresponden a la proteína soluble estabilizada  $\pm$  ES de tres replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ . Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

#### *4.4.4.3. Ensayo de estabilización con ácido desoxirribonucleico (ADN)*

Con el fin de buscar diferentes agentes capaces de estabilizar a las proteínas y visto que los compuestos poliméricos como en caso del APG han funcionado, se decidió probar con otro tipo de polímero que no se encuentre presente en el entorno donde dichas proteínas actúan en la planta. Por ello, es que se decidió ensayar si el ADN era capaz de estabilizar a alguna de las proteínas recombinantes obtenidas.

Para ello, se empleó ADN de esperma de salmón, disuelto en buffer HAc/Ac 20 mM, pH 4,5 a tres concentraciones distintas ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), y luego sonificado (Figura 4.14). En los datos se observa un bajo porcentaje de pérdida para las tres proteínas recombinantes, lo cual indica que las mismas fueron significativamente estabilizadas por las tres concentraciones de ADN ensayadas. Para el caso puntual del CBM-SIEXPA1 la pérdida de proteína luego del ensayo de estabilización no superó el 20% en ninguna de las tres condiciones ensayadas, mientras que para el caso de la EXP-SIEXPA1 la pérdida fue cercana al 30 % en las dos concentraciones más diluidas de ADN. Para el caso de la proteína completa la estabilización de la proteína fue casi máxima ya que los porcentajes de pérdida de proteína no superaron el 10% en ninguno de las tres concentraciones de ADN ensayadas.





**Figura 4.14. Estabilización de las proteínas con fragmentos de ADN en buffer HAC/Ac pH: 4,5.**

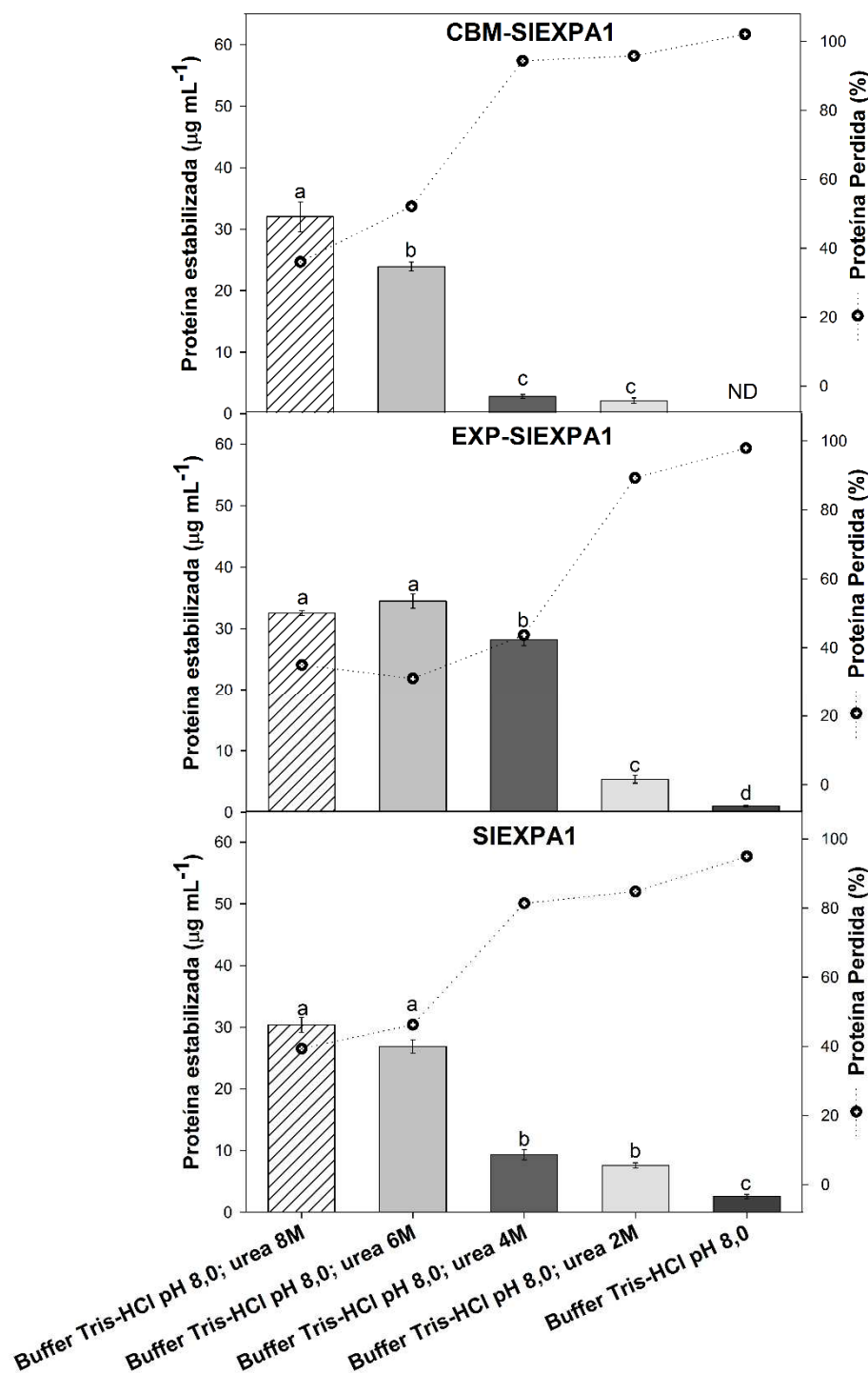
Análisis de la capacidad de estabilización de fragmentos de ADN a diferentes concentraciones ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) sobre: el dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); el dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1) y la expansina 1 de tomate completa (SI-EXPA1). La concentración inicial de proteínas fue igual a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada. Las barras representan a la concentración de proteína soluble estabilizada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) luego del proceso de repliegado de la proteína recombinante en cada condición. Los datos corresponden a la proteína soluble estabilizada  $\pm$  ES de tres

replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ ; Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

#### *4.4.4.4. Ensayo de estabilización/solubilización con urea*

Es conocido que la urea en una concentración 8 M actúa como un agente caotrópico que desmantela la estructura secundaria de las proteínas. Sin embargo, existen casos donde la urea es empleada a concentraciones menores en las cuales las proteínas se encuentran solubles y posiblemente con algo de estructura a medida que la concentración de urea disminuye. La urea se ha empleado para purificar proteínas valiéndose de la capacidad de los dominios de unión a celulosa (CBDs) de bacterias que poseen una unión muy fuerte a celulosa hasta en concentraciones de urea 6 M. (Berdichevsky y col., 1999). En base a estos antecedentes, se decidió probar el efecto de diferentes concentraciones de urea sobre la estabilidad o solubilidad de las tres proteínas. Se ensayaron cuatro concentraciones de urea (8 M, 6 M, 4 M, y 2 M) en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (Figura 4.15).

La presencia de urea 8 M o 6 M permitió recuperar aproximadamente 40-60% de las proteínas iniciales, tanto para los dos módulos como para la proteína completa. Concentraciones menores de urea (4 M y 2 M) provocaron una baja recuperación del CBM-SIEXPA1 y SIEXPA1. Sin embargo, aproximadamente un 60% del módulo catalítico (EXP-SIEXPA1) fue recuperado con urea 4 M.



**Figura 4.15. Efecto de la urea sobre la estabilidad de las proteínas recombinantes en buffer Tris-HCl pH 8,0.**

Análisis de la capacidad de estabilización de urea a diferentes concentraciones (8 M; 6 M; 4 M; 2 M) sobre: el dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); el dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1) y la expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1). La concentración inicial de las proteínas fue igual a 50 µg mL<sup>-1</sup>. Los círculos representan la pérdida de proteína (%) para cada condición ensayada. Las barras representan a la concentración de proteína soluble

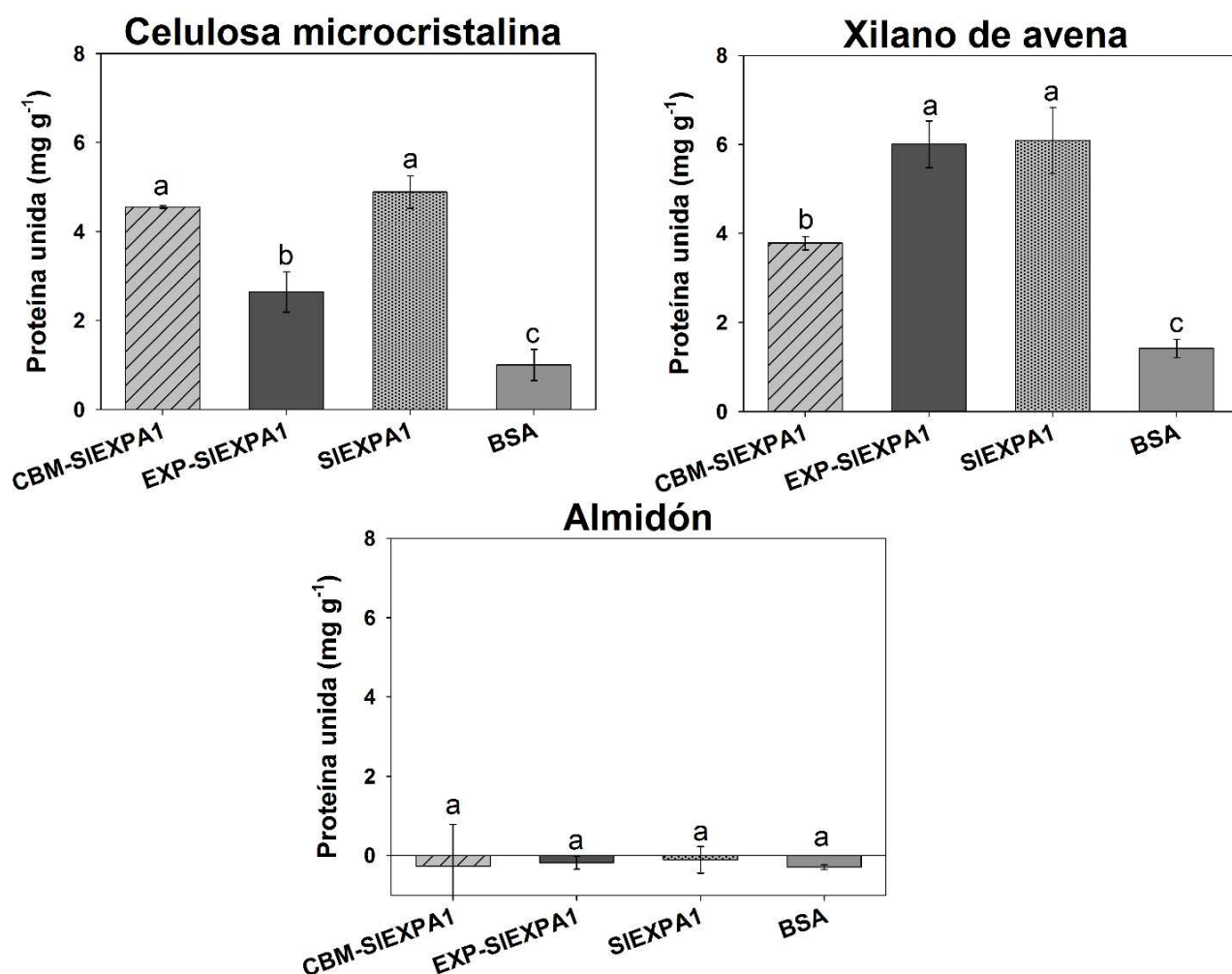
estabilizada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) luego del proceso de replegado de la proteína recombinante en cada condición. Los datos corresponden a la proteína soluble estabilizada  $\pm$  ES de tres replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ ; Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

#### **4.4.5. Ensayos de Unión**

Los ensayos de unión han sido ampliamente utilizados para probar la capacidad de unión de CBMs a diferentes sustratos (Chen y col., 1995; Nardi y col., 2013; Rodríguez-Sanoja y col., 2005; Sin y col., 2016). Por esto, decidimos valernos de este ensayo para probar la capacidad de unión de CBM-SIEXPA1; EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1 a diferentes polisacáridos que se encuentran en la pared celular, como celulosa microcristalina y xilano de avena. Aquí, es importante comentar, tal como se mencionó en la introducción general de la presente tesis (véase, sección 1.2.2.1), que los xilanos forman parte, aunque en baja proporción, de las hemicelulosas presentes en la pared celular vegetal. Asimismo, en el experimento, se incluyó al almidón como un control negativo, dado que este polímero no está presente en la pared celular vegetal y por lo tanto cabría esperar que no interactúe con ninguna de las proteínas. Además, para discriminar si la unión de las diferentes proteínas recombinantes a los polisacáridos era específica, se realizó el experimento en paralelo utilizando BSA (Albúmina de Suero Bovino) como control negativo de la proteína de unión, en lugar de la proteína recombinante.

La condición elegida de estabilización/solubilización de las proteínas fue en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, urea 6 M. Se decidió no usar otros agentes estabilizantes como (APG, APG hidrolizados, ADN) de modo de evitar que el ensayo se transformara en uno de competencia entre el agente estabilizante y el sustrato al cual se enfrenta. Para llevar a cabo el ensayo de unión,  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de proteínas fueron

estabilizadas de la misma manera que se describió en la sección 4.3.6. y la misma se enfrentó a los carbohidratos de interés por el lapso de 2 h, con agitación basculante, a 23 °C (véase, Figura 4.2).



**Figura 4.16. Ensayo de unión de las proteínas a diferentes carbohidratos.**

Análisis de la capacidad de unión de las diferentes proteínas estabilizadas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, urea 6 M, a celulosa microcristalina, xilano de avena y almidón. Dominio de unión a carbohidratos de la expansina 1 de tomate (CBM-SIEXPA1); dominio catalítico putativo de la expansina 1 de tomate (EXP-SIEXPA1); expansina 1 de tomate completa (SIEXPA1) y Albumina de suero bovino (BSA). Las barras corresponden a los mg de proteína unida por g de carbohidrato ensayado para una concentración de proteína libre constante de 30 µg mL<sup>-1</sup>. Los datos corresponden a los mg de proteína unida media ± ES de tres replicas biológicas independientes. Se realizó un análisis ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con  $p < 0,05$ ; Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas.

Para el caso de la celulosa microcristalina, se observó que tanto el CBM-SIEXPA1 como SIEXPA1 fueron los que presentaron la mayor afinidad por el sustrato, aunque el dominio EXP-SIEXPA1 también se unió (Figura 4.16).

En el caso del xilano de avena, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1 fueron las proteínas que presentaron mayor afinidad por el mismo. El dominio CBM-SIEXPA1 también se unió de manera específica al sustrato, aunque en menor proporción. Cabe mencionar que la BSA (proteína control de no unión) presentó niveles de unión muy bajos tanto para la celulosa microcristalina como para el xilano de avena. Finalmente, se observó que ninguna de las proteínas ensayadas se unió al almidón (sustrato que está ausente en la pared celular) (Figura 4.16).

## 4.5. DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido el uso de la tecnología del ADN recombinante en la expresión de proteínas heterólogas, especialmente en sistemas como *Escherichia coli* (*E. coli*). Un problema habitual en este sistema es que los altos niveles de sobreexpresión de proteínas conducen a menudo a su agregación y deposición en partículas densas e insolubles dentro de la célula huésped, los llamados cuerpos de inclusión (CI) (Gautam y col., 2012; Jungbauer y Kaar, 2007; Sin y col., 2016; Yamaguchi y col, 2013). La formación de los mismos es muy dependiente de las características de las proteínas que se desean sobreexpresar, pero es común que la producción de proteínas en *E. coli* derive en una producción en CI, lo que en la mayoría de los casos no es fácil de revertir (Jungbauer y Kaar, 2007).

En nuestro caso, se ha clonado y expresado con éxito el CBM-SIEXPA1, EXP-SIEXPA1 y SIEXPA1 recombinante en células de *E. coli*. La producción de éstas proteínas heterólogas condujo a la formación de CI, por lo que se optó por una estrategia de purificación en condiciones desnaturalizantes descrito por Schlager y col. (2012). Dicho método fue utilizado por Sin y col. (2016) en la purificación del CBM de la  $\alpha$ -arabinofuranosidasa de frutilla (*Fragaria x ananassa*) (CBM-FaARA1) a partir de CI. Posiblemente el hecho de obtener estas proteínas en agregados insolubles radique en que la SIEXPA1 es una proteína poco soluble de la pared celular, que posee un péptido señal de exportación al espacio apoplástico y que, previo a ser exportada, sufre una serie de modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, entre otras. Estas modificaciones no ocurren en el sistema de expresión de *E. coli*, y pueden ser la causa principal de la formación de CI.

La eliminación o reducción de los agentes desnaturalizantes presentes es necesaria a fines de facilitar el replegado de la proteína purificada. Para ello se pueden emplear diversos métodos, siendo los más comúnmente utilizados la dilución, diálisis, diafiltración, filtración en gel e inmovilización sobre un soporte sólido. Sin embargo, el replegado de proteínas obtenidas a partir de cuerpos de inclusión es una tarea difícil, y no existe un único protocolo aplicable a todas las proteínas, sino que es necesario adaptarlo a las características particulares de cada una de ellas (De Bernardez Clark, 1998; Middelberg, 2002; Yamaguchi y col., 2013). Existen numerosos ejemplos de uso de aditivos (agentes estabilizantes) en el proceso de replegado de una proteína (glicerol, arginina, sacarosa, sales, entre otros), algunos de los cuales fueron ensayados en el presente estudio, aunque sin éxito. Asimismo, se ensayaron algunos agentes estabilizantes poco convencionales, incluso, algunos de ellos de naturaleza polimérica.

El uso de APG fue probado por Sin y col. (2016) en la estabilización de un CBM putativo de  $\alpha$ -arabinofuranosidasa 1 de frutilla (*Fragaria x ananassa*). Sus resultados mostraron que a concentraciones de APG de 0,5% y hasta incluso en hidrolizados de 3 h de APG, la proteína se encontraba estabilizada. En nuestro caso, se ensayaron diversas concentraciones de APG a dos pH distintos (pH 4,5 y pH 6,0) así como también hidrolizados de APG, de diferentes grados de hidrolisis, sobre las tres proteínas. El comportamiento de la estabilización del CBM-SIEXPA1 como de la proteína completa, en general, fue similar entre sí, siendo las mejores condiciones de estabilización las concentraciones mayores de APG y menos hidrolizadas. Por su parte, el dominio catalítico putativo, resultó ser estable tanto a concentraciones de APG menores como a fracciones de APG más hidrolizadas (estable hasta APGh3) respecto



de las otras dos prtoteínas. El hecho de que con fracciones altamente hidrolizadas ninguna de las proteínas pueda ser estabilizada indicaría que es necesario un cierto tamaño de APG para que el mismo pueda ser empleado como agente estabilizante.

El hecho de que el APG estabilice a proteínas involucradas en el metabolismo de pared, podría deberse a que los componentes no celulósicos que componen la pared celular son exportados en vesículas que secreta el Aparato de Golgi (véase, 1.2.2), al igual que ocurre con estas proteínas ya que la misma *in vivo* posee un péptido señal que la dirige a la pared celular. Por ello, cabría esperar que, durante el proceso de ablandamiento de frutos carnosos, momento en el cual se sintetizan mayoritariamente estas proteínas del metabolismo de la pared celular, tanto los componentes no celulósicos de la pared como estas proteínas se secreten en conjunto y que las mismas se replieguen dentro de dichas vesículas secretoras (*in situ*).

Visto que existe evidencia de que los CBMs poseen afinidad por la celulosa (Nardi y col, 2013; Whitney y col., 2013), se decidió ensayar un derivado soluble de la misma, como lo es la carboximetilcelulosa. En este caso los resultados obtenidos mostraron que dicho derivado soluble no fue capaz de solubilizar a ninguna de las proteínas ensayas.

Otro agente estabilizante empleado fue el ADN. Si bien no es de esperar que esta interacción tenga lugar *in vivo*, las tres proteínas fueron estabilizadas en las tres concentraciones de ADN ensayadas. La cromatina es la forma en la que se presenta el ADN de manera compacta en el núcleo celular. La misma está formada por ADN y una serie de proteínas como las histonas. Dichas proteínas son proteínas básicas que se encargan de apantallar las cargas negativas producto de los grupos fosforilos

expuestos que presenta en ADN doble hebra, que a pH citosólico (pH 7,0-7,4) se encuentran desprotonados. Esto es crucial para la compactación del material genético en el núcleo celular. Nuestras proteínas, según predicciones de su pI (pI predichos *in silico*: CBM-SIEXPA1 pI: 10,45; EXP-SIEXPA1 pI: 8,95; SIEXPA1 pI: 9,70), son básicas a pH 4,5 que fue el pH en el ensayo de estabilización por ADN. Suponiendo que el ADN a pH 4,5 se encuentra cargado negativamente, podríamos presumir que la estabilización podría deberse a interacciones del tipo electrostáticas.

Por otra parte, se ensayó la capacidad de solubilizar las proteínas por parte de la urea a diferentes concentraciones. Se observó que tanto el CBM-SIEXPA1 como la proteína completa se mantuvieron solubles incluso a concentraciones de urea 6 M, mientras que para el dominio catalítico putativo dicha solubilización fue posible incluso a urea 4 M. Tomando en cuenta el comportamiento de la estabilización de las proteínas con la mayoría de los agentes estabilizantes ensayados, podemos observar que tanto el CBM-SIEXPA1 como la SIEXPA1 presentan comportamientos de estabilización/solubilización similares. Esto podría hacernos presuponer que la estabilidad de la proteína completa está mayoritariamente definida por el dominio CBM ya que en la mayoría de los casos la estabilidad del dominio catalítico putativo resultó ser mayor en condiciones más desfavorables (menor concentración de agente estabilizante).

Es ampliamente conocido el uso de dominios de unión a celulosa (CBD, *del inglés*, cellulose binding domain) de diferentes procedencias (celulasas, endoglucanasas) de bacterias u hongos, como etiquetas para la purificación de proteínas de interés (Berdichevsky y col., 1999; Levy y Shoseyov, 2002). En este marco, se ha descrito el uso de un CBD de *C. thermocellum* (GenBank Accession N°.

X68233) como etiqueta para el aislamiento de anticuerpos recombinantes de cadena única en una forma biológicamente activa tras la expresión como CI en *E. coli*. Básicamente, los cuerpos de inclusión se solubilizan y se desnaturalizan mediante un disolvente caotrópico, y luego se inmovilizan reversiblemente sobre una matriz de celulosa. Dicha inmovilización minimiza el contacto entre moléculas, evitando así su agregación. Este CBD es único en mantener su capacidad específica de unión a celulosa cuando se solubiliza en urea hasta concentraciones 6 M, mientras que las proteínas fusionadas a él están totalmente desnaturalizadas. Por último, el replegamiento de las proteínas de fusión se induce reduciendo lentamente el agente desnaturalizante mientras está en contacto con la matriz de celulosa (Berdichevsky y col., 1999).

Considerando este antecedente con un dominio de unión a celulosa, y tratando de evitar la presencia de agentes estabilizantes (APG, hidrolizados de APG o ADN), que pudieran competir en un ensayo de unión con el sustrato ensayado, se decidió realizar los ensayos de unión con proteínas solubilizadas en buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; urea 6 M. Esta condición fue entonces la utilizada para ensayar la capacidad de unión de las tres proteínas sobre celulosa microcristalina, xilano de avena y almidón. Se encontró que las tres proteínas se unieron a celulosa microcristalina y a xilano de avena, pero no así al almidón. También se demostró que la albumina de suero bovina (proteína control de no unión) no se unió a ninguno de los sustratos. En el caso de la celulosa microcristalina, tanto la proteína completa como el dominio CBM presentaron una mayor afinidad que el dominio catalítico putativo. En cambio, para el xilano de avena se observó que el dominio catalítico putativo y la proteína completa presentaron una mayor afinidad que el CBM (Figura 4.16). En este punto es importante mencionar

que no es estrictamente correcto comparar la capacidad de unión de una proteína a diferentes carbohidratos, esta salvedad radica en que, si bien los ensayos comúnmente se estandarizan por masa de carbohidrato enfrentada a una determinada concentración de proteína, la cantidad de posibles sitios de unión que presenta cada carbohidrato no es comparable. Independientemente de esta salvedad, sí podemos comentar que una determinada proteína posee afinidad por un sustrato o no y también podemos comparar dentro de un mismo sustrato afinidades diferenciales de distintas proteínas.

Los resultados descriptos aquí para el CBM-SIEXPA1 coinciden con lo observado para otro CBM presente en una expansina de fruto. Nardi y col. (2013) sobreexpresaron el CBM de la Expansina 2 de frutilla (FaEXPA2), y caracterizaron su capacidad de unión sobre diferentes sustratos. En ese trabajo se demostró que, *in vitro*, el dominio CBM se une principalmente a celulosa microcristalina, y también, aunque con menor afinidad, a xilano de avena y pectinas de citrus. Si bien en este trabajo no se hicieron ensayos de unión a pectinas, el hecho de que se haya demostrado la capacidad de APG y algunos de sus hidrolizados para estabilizar las proteínas y mantenerlas en solución, indican que la proteína completa (SIEXPA1) y los dominios que la integran (CBM-SIEXPA1 y EXP-SIEXPA1) se unen a homogalacturonanos.

Los resultados obtenidos en los ensayos de unión están en línea con el modelo propuesto por Cosgrove (2000). En el mismo se propone que el dominio CBM actuaría anclando a la expansina a la superficie de la celulosa, mientras el dominio catalítico putativo (EXP) interactuaría con las hemicelulosas (xiloglucanos o xilanos) en la superficie de las microfibrillas (véase Figura 1.8). Nuestros resultados están en concordancia con este plausible mecanismo de interacción, teniendo en cuenta que los datos probablemente más destacados, son que la afinidad por celulosa microcristalina

del CBM y de la proteína completa son comparables; y que la afinidad por el xilano de avena del dominio catalítico putativo y de la proteína completa también son comparables.

# ***5. CAPÍTULO III***

***“EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DEL CBM-SLEXPA1 SOBRE  
PLANTAS Y FRUTOS DE TOMATE”***

## **5.1. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

El ablandamiento que se produce durante la maduración de los frutos carnosos es uno de los principales actores determinantes de su calidad y vida poscosecha. La firmeza del fruto depende de varios factores, incluyendo la rigidez mecánica determinada por la pared celular vegetal (Harker y col., 1997).

Tal como se comentó en la introducción general de la presente tesis, una red de microfibrillas de celulosa incrustadas en una matriz compleja de pectinas y hemicelulosas constituyen las paredes celulares primarias de las plantas superiores. Durante la maduración del fruto, la acción combinada de proteínas y enzimas hidrolíticas producen la reducción, solubilización y la despolimerización de los componentes polisacáridos del pericarpio de la pared celular (Brummell, 2006; Taiz y Zeiger., 2006). Se ha postulado que las expansinas causan la relajación de la estructura de la pared celular (debilitando las interacciones no covalentes entre la celulosa y las hemicelulosas) y de ese modo facilitan el acceso de otras enzimas a sus sustratos (Cosgrove, 2000; McQueen-Mason y Cosgrove, 1995).

Basados en los patrones de expresión y acumulación, a nivel de ARNm, se ha propuesto que las expansinas participan en modificaciones de la pared celular vegetal (Cosgrove, 2000; Lee y col., 2001) en diferentes momentos del crecimiento y desarrollo de una planta y, durante la maduración del fruto, cuando el tamaño del receptáculo se mantiene sin cambios, pero el ablandamiento de la pared es importante (Cosgrove, 2000; Hiwasa y col., 2003; Rose y Bennett, 1999). Un análisis sobre los patrones de expresión de las expansinas en frutos de tomate, frutilla, durazno, pera y otros frutos carnosos, ha puesto en evidencia que dichos patrones difieren entre cultivares de

firmeza contrastante para un mismo fruto (Brummell y col., 1999; Dotto y col., 2006; Harrison y col., 2001; Hayama y col., 2003; Hiwasa y col., 2003).

De los 38 genes de expansinas detectados en tomate (Lu y col., 2015), seis de ellos se expresan en el fruto (véase, sección 1.4.1), dentro de los cuales *SIEXPA1* se destaca por sus características particulares asociadas a la maduración del fruto. Rose y col. (1997) identificaron a esta  $\alpha$ -expansina específica del fruto en tomate, la cual se acumula durante la maduración a partir del estadio pintón (aparición de color anaranjado). Se ha informado que la supresión de la expresión de *SIEXPA1* en tomate provocó la generación de frutos más firmes en relación a los controles acigotas a lo largo de la maduración, mientras que la sobreexpresión de dicho gen dio origen a frutos significativamente más blandos (Brummell y col., 1999b). Asimismo, la supresión conjunta de *SIEXPA1* y poligalacturonasa de *S. lycopersicum* (*LePG*, actualmente, *SIPG*) en frutos de tomate permitió obtener frutos con menor susceptibilidad a *Botrytis cinerea* (Cantu y col., 2008).

Una característica común de la estructura de la mayoría de las proteínas implicadas en el metabolismo de la pared celular es su organización modular. Típicamente, las proteínas incluyen un dominio catalítico putativo característico y uno o más módulos de unión a carbohidratos (CBM), unidos por una cadena no estructurada (Shoseyov y col., 2006). Un CBM se define como una secuencia de aminoácidos contigua dentro de una enzima con actividad sobre carbohidratos, con plegamiento predicho y capacidad de unirse a carbohidratos (Coutinho y Henrissat, 1999). En las plantas, la presencia de CBMs putativos ha sido descrita en endoglucanasas (Levy y Shoseyov, 2002),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (Sin y col., 2016) y expansinas (Nardi y col., 2015; Yennawar y col., 2006). Se ha reportado que la sobreexpresión de CBMs de



diferentes fuentes en diversos sistemas vegetales, provocan cambios en los fenotipos de estas plantas (Nardi y col., 2015; Obembe y col., 2007; Safra-Dassa y col., 2006).

Nuestra hipótesis es que la sobreexpresión del CBM presente en la expansina 1 de *S. Lycopersicum* reduciría el acceso de expansinas endógenas y de otras enzimas a sus sustratos, causando una reducción general en la degradación de la pared celular de los frutos y, por lo tanto, un menor ablandamiento del fruto y una menor susceptibilidad a las infecciones fúngicas. Por ello, se decidió sobreexpresar, de forma constitutiva, el CBM correspondiente a la expansina 1 de tomate, SIEXPA1, en la pared celular vegetal, usando tomate como planta modelo.

---

## 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, var. *Ailsa Craig*) sobreexpresantes de *CBM-SIEXPA1* en la pared celular.
- ✓ Analizar el efecto de la sobreexpresión o sobre la degradación de pared celular, el ablandamiento y parámetros de calidad del fruto (contenido de azúcares y ácidos, desarrollo de color, deterioro poscosecha).

## 5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1. Clonado de CBM-SIEXPA1 y generación del constructo

Para generar la sobreexpresión de la proteína CBM-SIEXPA1 en la pared celular de tomate, se tomó como punto de partida a la estrategia descrita por Nardi y col. (2015). En primer lugar, se realizó un análisis *in silico* para identificar y delimitar el péptido señal (PS) y los dominios conservados presentes en la proteína SIEXPA1, haciendo uso del programa en línea SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; (Petersen y col., 2011)) y de la base de datos PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>; (Sigrist y col., 2013)).

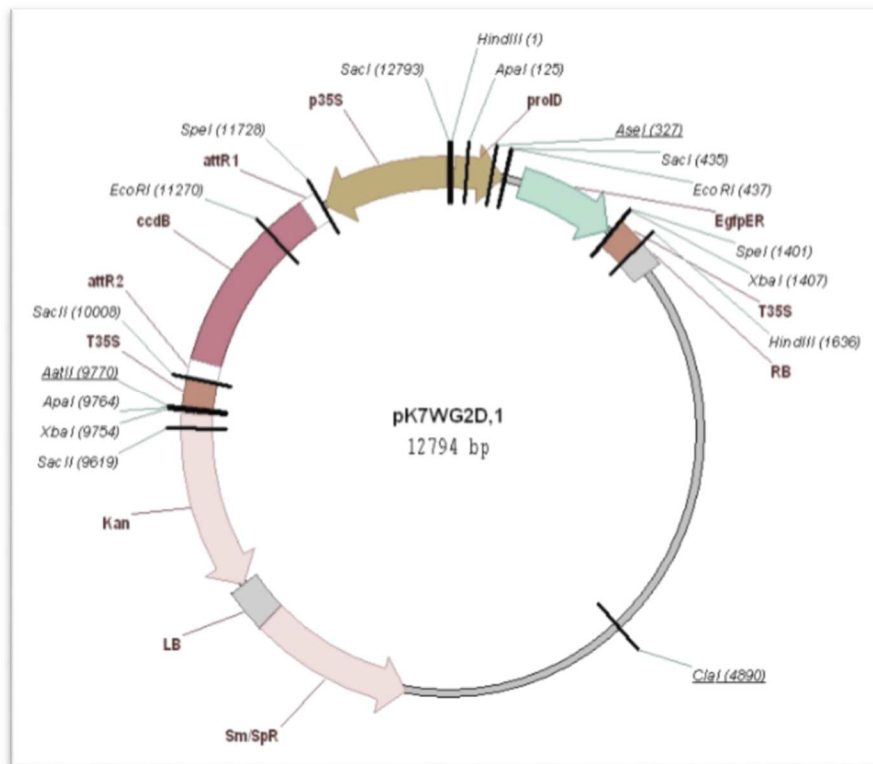
Una vez identificadas y delimitadas la secuencias que codifican el PS y el módulo de unión a carbohidratos (CBM), se fusionaron ambas secuencias a través de dos reacciones de PCR independientes (PCR1 y PCR2) utilizando cebadores específicos y un plásmido que contiene la secuencia completa del ADNc de *SIEXPA1* (número de acceso: NM\_001247029.2; (Rose y col., 1997)) como molde.

Para la generación del vector de interés con el inserto correspondiente, se empleó la tecnología de recombinación Gateway®. Los cebadores utilizados en la PCR1 fueron: **cebador 5**, cebador quimérico directo que contiene la secuencia del sitio de recombinación attB1 (31 nucleótidos, en minúsculas) y 22 nucleótidos complementarios con el péptido señal (en mayúsculas): 5'-ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttaATGGGTATCATAATTTTCATCC-3'; **cebador 6**, cebador quimérico reverso que contiene un fragmento de la secuencia complementaria al extremo 3' del PS (*cursiva*) y 21 nucleótidos complementarios al extremo 5' del CBM (*subrayado*): 5'-TCCATTGATGGTAAATCTGAT*TCTTCCTTCAACAATGTTGAA*-3'. El producto de la

PCR1 se purificó usando el kit de purificación de productos de PCR (GE®), para ser usado en la segunda PCR (PCR2) como cebador directo.

Los cebadores utilizados en PCR2 fueron: **cebador 7 (directo)**, producto de amplificación PCR1: 5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttaATGGGTATCATAATTTTCATCCTTGTTCTTCTTTTTGTAGACTCATGTTTCAACATTGTTGAAGGAAGAATCAGATTTACCATCAATGGA-3'; **cebador 8 (reverso)**, cebador quimérico que contiene la secuencia de sitio de recombinación attB2 (minúsculas), un codón de stop (en negrita) y 22 nucleótidos complementarios al extremo 3' de la secuencia del CBM: 5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggta**TTATATTTT**GAAATTCTTTCCGATG-3'.

Una vez generados y chequeados los productos de PCR, se generó el clon de entrada, insertando el producto de la PCR2 en el vector de entrada pDONR™221 (Invitrogen™) mediante una reacción estándar de recombinación BP (sistema Gateway®). Una vez obtenido el mismo, se generó el clon de expresión a través de una recombinación LR (sistema Gateway®) entre el clon de entrada y el vector de destino pK7WG2D.1 (Karimi y col., 2002), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El vector pK7WG2D.1 es un vector binario que conduce la expresión constitutiva del gen de interés bajo el promotor del virus del mosaico del coliflor (CaMV-P35S); tiene kanamicina como gen de resistencia en plantas, estreptomicina como gen de resistencia en bacterias (*A. tumefaciens*) y expresa GFP (*del inglés: Green fluorescent protein*; proteína fluorescente verde) bajo un promotor específico de raíz (ProlD) (Figura 5.1)



**Figura 5.1. Representación esquemática del vector binario pK7WG2D,1.**

El vector se empleó para conducir la sobreexpresión de *CBM-SIEXP1* en la pared celular de plantas de tomate bajo el promotor específico P35S.

### 5.3.2. Transformación de las plantas

El constructo (*pK7WG2D,1 [CBM-SIEXPA1]*) mencionado en el punto anterior, se utilizó para transformar células de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101), las cuales se usaron a su vez para transformar explantos de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, cv Ailsa Craig). Las plantas transgénicas se obtuvieron mediante técnicas de cultivo de tejidos “*in vitro*” seguido de la regeneración de los explantos. Para esta última etapa, se utilizó el servicio técnico del Centro de Transformación de Plantas, Ralph M. Parsons, perteneciente a la Universidad de California, Davis.

### **5.3.3. Material vegetal y condiciones de cultivo**

Las plantas de tomate fueron cultivadas en un invernadero bajo condiciones de luz natural y temperatura controlada (16-27 °C) en la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) en macetas de 10 L en tierra:perlita (3:1) como sustrato. Para la clasificación de los estadios de madurez de los frutos se siguieron los criterios detallados en el capítulo 1 (véase, sección 3.3.1; Tabla 3.1; Figura 3.1).

### **5.3.4. Extracción de ARN y caracterización genotípica de las plantas**

Se emplearon frutos en el estadio de madurez pintón (Pi), previamente congelados en nitrógeno líquido, molidos y conservados a -80°C hasta su uso, para realizar la extracción de ácido ribonucleico (ARN). El ARN de fruto se extrajo usando TRI Reagent® (Sigma-Aldrich®) siguiendo las especificaciones del fabricante, con modificaciones menores. Después de la precipitación del ARN con isopropanol, recomendada por el fabricante, el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70% v/v y se redisolvió en H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub> para luego comenzar una etapa de precipitación con acetato de sodio 3 M a -20 °C durante 1 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 20 min a 4 °C, se lavaron nuevamente con 500 µL de etanol 70% v/v y finalmente se redisolvieron en 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub>.

El contenido de ARN en cada muestra se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro, midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm y 280 nm. Alícuotas conteniendo 6 mg de ARN, se trataron con una ADNasa (RQ1DNase, Promega®), de acuerdo con la especificación del fabricante, y se purificaron adicionalmente por una extracción orgánica con cloroformo:1-octanol (24:1).

Seguidamente, la fase acuosa se precipitó con acetato de sodio 3 M a -20 °C durante 1 h, se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4 °C, se lavó con 500 µL de etanol 70% v/v y finalmente, se redisolvió en 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub>.

El ARN purificado se utilizó para la síntesis de ADNc usando una transcriptasa inversa (MML-V, Promega®) y hexámeros aleatorios (Promega®). El ADNc se utilizó como molde para ensayos de PCR de punto final para la selección de plantas transgénicas. Como gen de referencia se usó el gen del factor de elongación  $\alpha$  1 (SIEf1 $\alpha$ , Solyc06g005060) y los cebadores específicos empleados fueron: SIEf1 $\alpha$  (directo): 5'-TCCAAAGATGGTCAGACCCGTGAA-3'; y SIEf1 $\alpha$  (reverso): 5'-ATACCTAGCCTTGG AGTACTTGGG-3'; (Pombo y col., 2014). Para el gen de interés (*P35S-CBM-SIEXPA1*) los cebadores específicos usados fueron: P35S-CBM-SIEXPA1 (directo): 5'-GCGGCCG CACTAGTGATA-3' (este cebador se diseñó sobre el 5'UTR de la secuencia de ADNc del promotor P35S) y P35S-CBM-SIEXPA1 (reverso): 5'TGCACCTGCTACATTCGTGA-3'.

Estos cebadores se emplearon para verificar la integridad del ADNc obtenido (*SIEf1 $\alpha$* ) y luego determinar la presencia del transgen (*P35S-CBM-SIEXPA1*), de modo de poder clasificar las plantas como acigotas o sobreexpresantes del gen de interés (*CBM-SIEXPA1*).

### **5.3.5. Caracterización fenotípica de las plantas**

#### *5.3.5.1. Altura del tallo principal y número de racimos florales y flores*

Tanto la altura como el número de racimos florales y el número de flores por racimo se midieron a los 40 y 60 d post germinación en plantas transgénicas, acigotas y WT.

La altura de la planta se tomó desde la base hasta el peciolo de la última hoja expandida. En el caso de las flores, sólo se contaron los racimos que tenían las flores completamente expandidas. Se contaron tanto el número de racimos como el número de flores por racimo y totales en la planta.

#### *5.3.5.2 Área foliar y medida de SPAD*

El contenido de clorofila de la 4ª y 5ª hoja compuesta, contado a partir de la base, de las plantas transgénicas, acigotas y WT se estimó con un medidor de clorofila no destructivo (SPAD 502, Minolta, Japón) a 40 y 60 d post germinación. Se realizaron cinco mediciones a lo largo de cada hoja compuesta por ensayo.

Se determinó el área foliar de la 4ª y 5ª hoja compuesta de plantas transgénicas, acigotas y WT después de los 40 d post germinación. Para ello, se tomaron fotografías de las hojas en la planta, sobre una superficie con escala y éstas se analizaron usando el editor de imagen ImageJ software (Schneider y col., 2012) para calcular el área foliar.



### 5.3.6. Caracterización de las propiedades mecánicas de las hojas compuestas

Para caracterizar las propiedades mecánicas de las hojas compuestas se optimizaron dos ensayos complementarios; un ensayo de extensión y un ensayo de penetración de las hojas.

El ensayo de *extensión* se realizó con el equipo analizador de textura (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Texture Technologies®, Scarsdale, NY) en el modo de tensión, equipado con mordazas de tracción en miniatura (Tensile grips A/MTG). Se cortaron secciones paralelas a la nervadura central (1 cm x 2 cm) de la hoja, cuidando de excluir la nervadura, y se sujetaron con las mordazas provistas por el dispositivo. La prueba de extensión se realizó a una velocidad constante de 0,1 mm s<sup>-1</sup> hasta provocar la rotura, y se registró la fuerza aplicada (gr). Los datos se expresaron como la fuerza (gr) necesaria para romper la sección de la hojuela terminal (fuerza de ruptura). Se midieron 2 secciones de 5 hojuelas apicales por planta.

El ensayo de *penetración* de la hoja también se realizó utilizando el equipo analizador de textura, pero en este caso en modo de compresión, equipado con una sonda cilíndrica plana "*ad-hoc*" de 1 mm de diámetro. El ensayo consistió en la penetración de la hojuela terminal, en cuatro puntos diferentes, en zonas a 1 cm de distancia de la nervadura central. El ensayo de compresión se realizó a una velocidad constante de 0,1 mm seg<sup>-1</sup> hasta la total penetración de la hoja, y se determinó la fuerza (gr) necesaria para penetrar el tejido (fuerza de penetración). Las medidas se realizaron por cuadruplicado por hojuela terminal y se analizaron cinco hojas por planta.

### **5.3.7. Determinación de parámetros de calidad del fruto**

Para estas determinaciones, se cosecharon frutos de tomate en cuatro diferentes estadios de madurez: Verde Maduro (VM), Pintón (Pi), Rojizo (R) y Maduro (M) (véase, Tabla 3.1. y Figura 3.1.) con un peso comprendido entre 25 y 35 gr, de plantas WT, acigotas y sobreexpresantes. Los frutos se diseccionaron para aislar el pericarpio, trozaron y congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

#### *5.3.7.1. Determinación de sólidos solubles*

Las muestras se prepararon de acuerdo con el método AOAC 932.12 (AOAC 932.12, 1998) y las mediciones se llevaron a cabo en un refractómetro Milwaukee (MA871). Las muestras se midieron por triplicado y los resultados se expresaron como grados Brix (°Brix).

#### *5.3.7.2. Acidez titulable y pH*

Cinco gramos de frutos congelados se pulverizaron en un molinillo y se resuspendieron en 50 mL de agua destilada. El pH del homogeneizado se midió y el contenido de ácidos se determinó por titulación con NaOH 0,05 M hasta pH 8,2 (AOAC 981.12, 1998) utilizando un pHmetro Oakton (pH serie 1100). Las mediciones se realizaron por triplicado y la acidez titulable se expresó como mili-moles de H<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup> de fruto fresco.

### **5.3.8. Aislamiento de polisacáridos de la pared celular**

Los polisacáridos totales de la pared celular se obtuvieron como residuo insoluble en alcohol (RIA) de acuerdo a Rosli y col., (2004) con algunas modificaciones. Aproximadamente 2,5 g de frutos en diferentes estadios de madurez (VM, Pi, R y M), previamente pulverizados con nitrógeno líquido, se homogeneizaron con 10 mL de etanol absoluto y la mezcla se hirvió (85 °C) a reflujo durante 30 min. Los homogeneizados se filtraron y los residuos sólidos se lavaron tres veces con 5 mL de etanol absoluto. Posteriormente, se secaron durante toda la noche a 37 °C y se pesaron con una balanza analítica de precisión. El RIA total se expresó como mg RIA por cada 100 mg de tejido (mg RIA 100mg<sup>-1</sup>fruto). Los RIA se obtuvieron a partir de tres tandas de frutos independientes.

#### *5.3.8.1. Extracción y cuantificación de pectinas, hemicelulosas y celulosa*

En primer lugar, 50 mg de RIA de cada condición se trataron con 20 mL de DMSO al 90% (v/v) durante 48 h a temperatura ambiente, con la finalidad de extraer el almidón (Carpita y Kanabus, 1987) y eliminar posibles interferencias con el análisis de los demás polisacáridos.

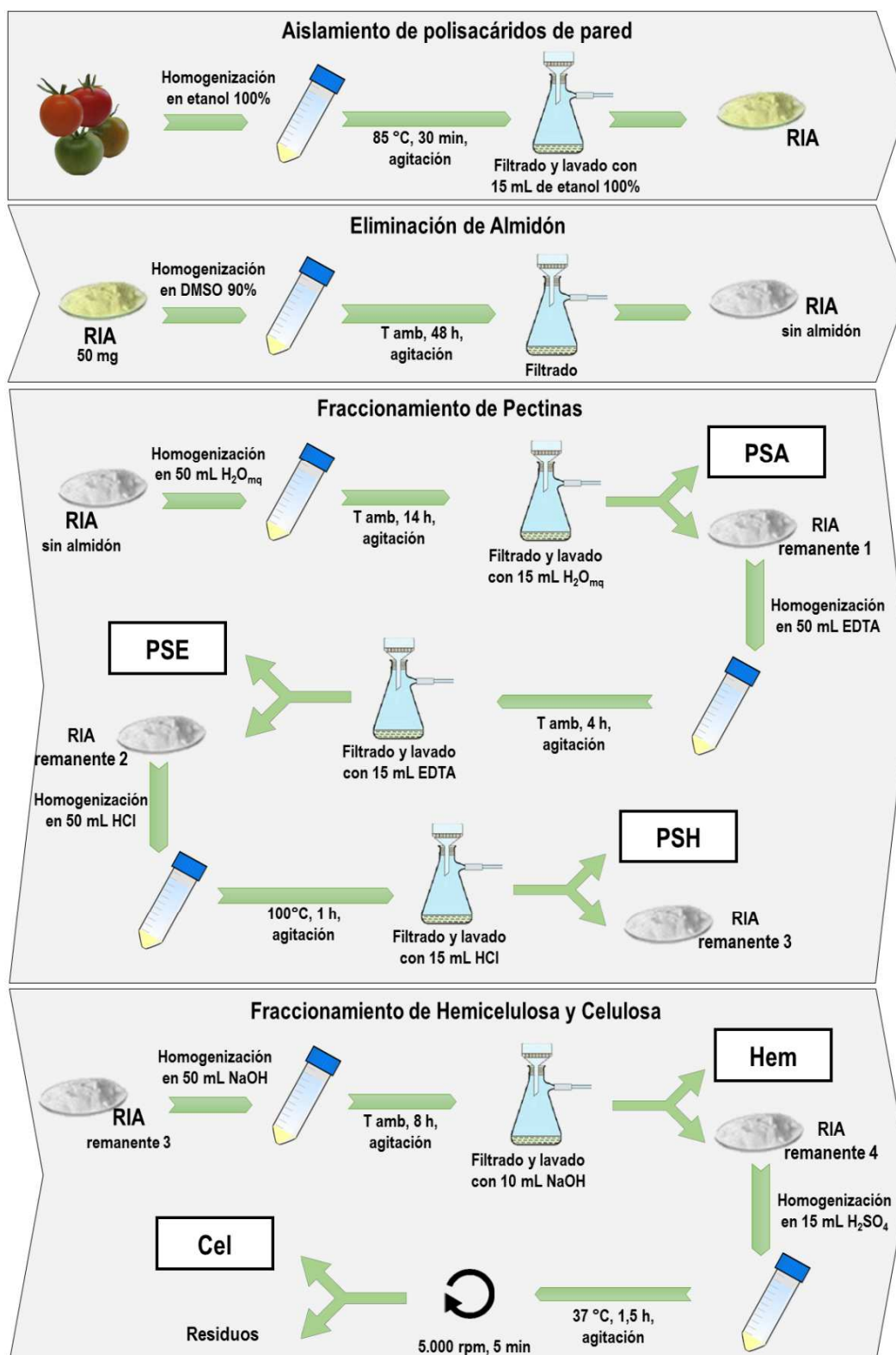
Las pectinas se aislaron de acuerdo con Nara y col., (2001) y Rosli y col., (2004) con algunas modificaciones. Las fracciones obtenidas fueron: Pectinas Solubles en Agua (PSA); Pectinas Solubles en EDTA (PSE) y Pectinas Solubles en HCl (PSH).

Para ello, el residuo sólido obtenido luego del tratamiento con DMSO se resuspendió en 50 mL de H<sub>2</sub>O<sub>mq</sub> y se agitó durante 14 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró y el sólido se lavó 3 veces con 5 mL de agua destilada. El sobrenadante filtrado es la fracción enriquecida en Pectinas Solubles en Agua (PSA).

Seguidamente, el residuo se resuspendió en 50 mL de acetato de sodio 0,05 M; EDTA 0,04 M, pH 4,5 y se agitó durante 4 h a temperatura ambiente. El homogenato se filtró y el sólido resultante se lavó 3 veces con 5 mL de la misma solución (Fracción enriquecida en Pectinas Solubles en EDTA (PSE)). El sólido proveniente de la extracción previa se resuspendió en 50 mL de HCl 0,05 M y se calentó a 100 °C durante 1 h. Luego de enfriadas las suspensiones, se filtraron y el residuo se lavó 3 veces con 5 mL de HCl 0,05 M (Fracción enriquecida en Pectinas Solubles en HCl (PSH)). La concentración de ácidos urónicos de cada fracción se estimó por el método del 2-fenilfenol (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973) usando ácido galacturónico (AG) 1 mM (Fluka) para construir una curva de calibración.

El residuo resultante de la extracción de pectinas se agitó durante 8 h con 50 mL de NaOH 4 M a temperatura ambiente. El homogenato se filtró y lavó con 5 mL de NaOH 4 M (Fracción enriquecida en hemicelulosas). El sólido remanente, se resuspendió en 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 66% v/v y se agitó durante 1,5 h a 37 °C (Fracción enriquecida en celulosa).

Previo a la cuantificación de ambas fracciones se realizó una hidrólisis completa con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 66% (v/v) a 37 °C durante 90 min. El contenido de hemicelulosas y celulosa se estimó mediante el método de antrona (d'Amour y col., 1993). Se utilizaron cantidades variables de una solución de glucosa (4 mg mL<sup>-1</sup>) para construir una curva de calibración. La extracción de los componentes de pared celular se realizó por duplicado, y las colorimetrías correspondientes a su cuantificación también se realizaron por duplicado.



**Figura 5.2. Representación esquemática del fraccionamiento de los polisacáridos de pared celular.**

Residuo insoluble en alcohol (RIA); Fracción enriquecida en Pectinas Solubles en agua (PSA); Fracción enriquecida en Pectinas Solubles en EDTA (PSE); Fracción enriquecida en Pectinas Solubles en ácido clorhídrico (PSH); Fracción enriquecida en Hemicelulosas (Hem) y Fracción enriquecida en Celulosa (Cel).

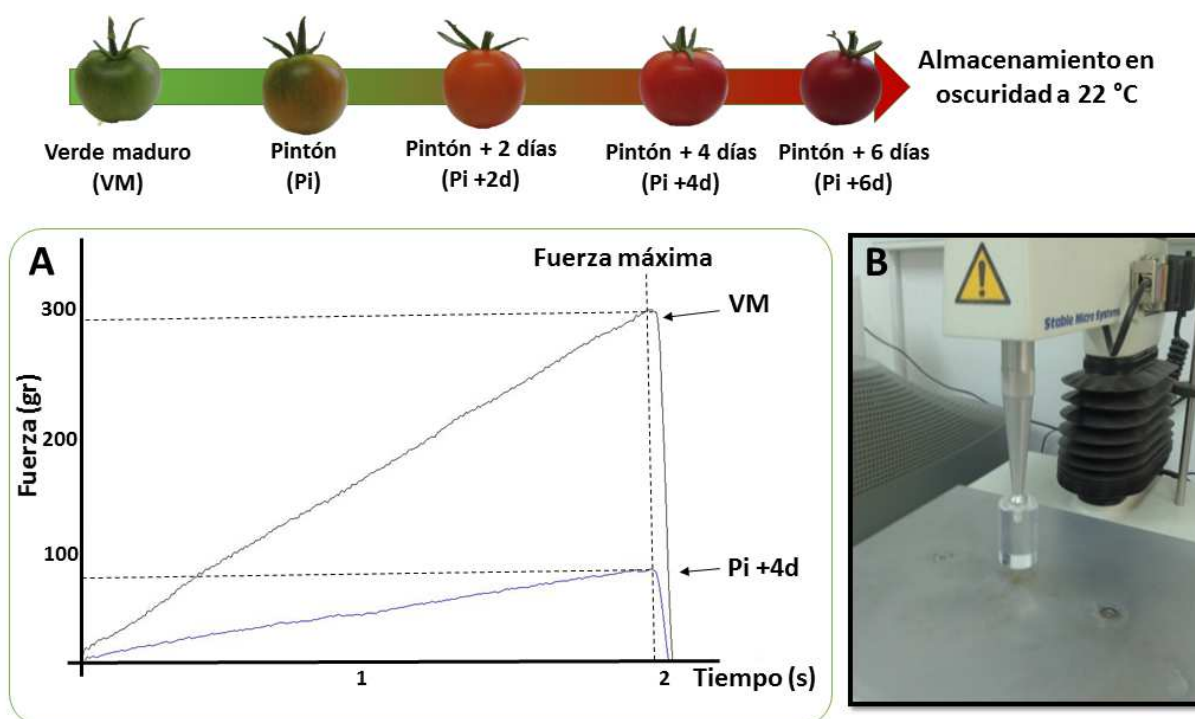
### **5.3.9. Ensayo poscosecha**

Frutos en el estadio de madurez verde maduro (VM) con un peso entre 25 gr y 35 gr se cosecharon de plantas WT, acigotas y sobreexpresantes para realizar los ensayos de poscosecha. La firmeza del fruto y el color superficial se midieron inmediatamente después de la cosecha y posteriormente fueron almacenados en un cuarto oscuro a 22 °C. Cuando los frutos alcanzaron el estadio de madurez pintón (Pi), los mismos parámetros fueron medidos cada 2 d por un lapso de 6 d (Pi, Pi+2, Pi+4 y Pi+6). Se realizaron tres cosechas independientes, y se analizaron 6-8 frutos por cada planta en cada cosecha.

#### *5.3.9.1. Determinación de la firmeza del fruto*

Se evaluó la firmeza del fruto midiendo la fuerza máxima (gr) generada cuando el fruto es comprimido 0,5 mm con una sonda de flexiglás cilíndrica de 25 mm de diámetro (código: P/25P) instalado en un dispositivo analizador de textura (TA.XTplus, Stable Micro Systems, Texture Technologies®, Scarsdale, NY) (Figura 5.3). Los parámetros de ajustes utilizados fueron: celda de carga PL/CEL/30; modo de prueba: compresión; velocidad pre-prueba: 2 mm seg<sup>-1</sup>; velocidad post-prueba: 10 mm seg<sup>-1</sup>. Cada fruto fue medido dos veces en lados opuestos de la zona ecuatorial central.

Los datos se registraron utilizando el adquisidor de datos proporcionado por el equipo (Exponent Lite Análisis Software®), a una tasa de adquisición de 200 datos por segundo.

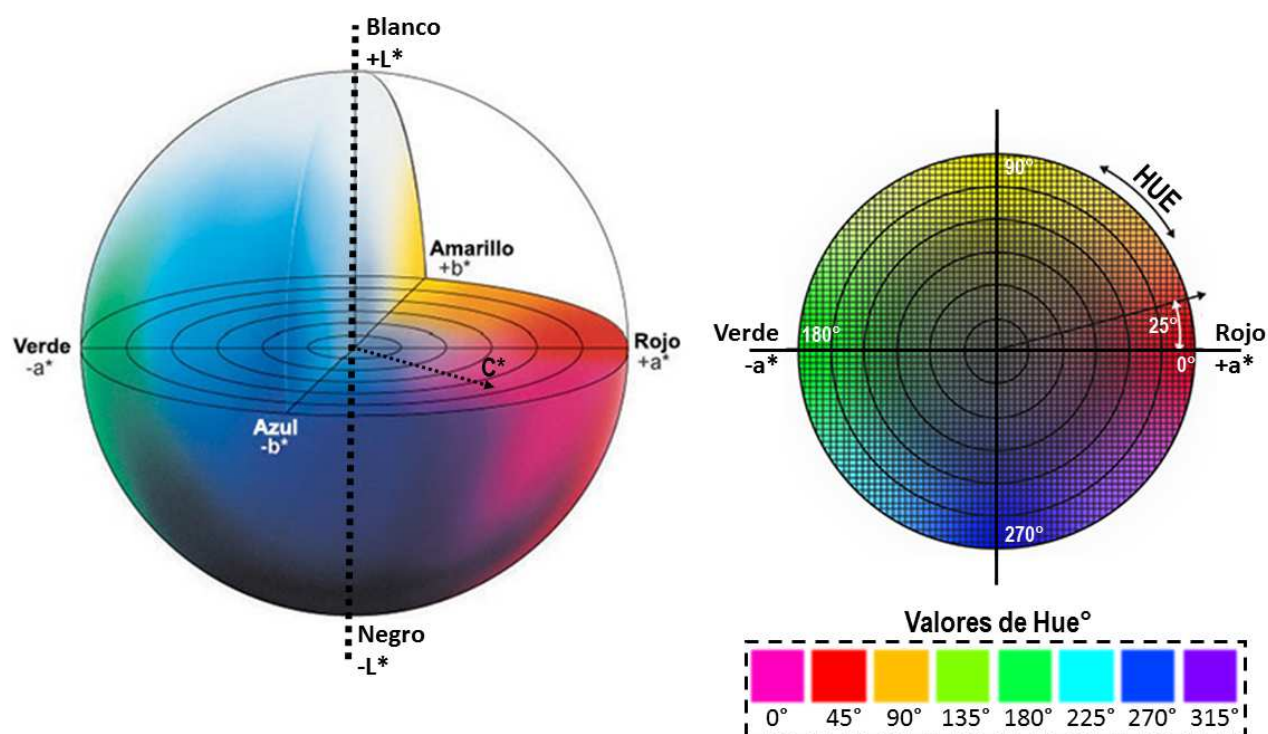


**Figura 5.3. Representación esquemática del ensayo poscosecha.**

**A)-** Curvas representativas obtenidas en la compresión de 0,5 mm de un fruto verde maduro (VM) y de un fruto pintón + 4 días (Pi + 4d) sobre la zona ecuatorial del mismo. **B)-** Fotografía de la sonda empleada en la compresión de los frutos.

#### 5.3.9.2. Cuantificación del color superficial

El color superficial del fruto se evaluó con un medidor de color (colorímetro) Chroma (CR300, Minolta, Osaka, Japón), adquiriendo los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , y calculando el ángulo de matiz, (Hue°, tono) usando las siguientes fórmulas:  $HUE^\circ = \arctan(b/a)$  cuando  $a > 0$  y  $b > 0$ ;  $HUE^\circ = 180^\circ - \arctan(b/a)$  cuando  $a < 0$  y  $b > 0$  (Figura 5.4). Se realizaron tres medidas en la zona ecuatorial por cada fruto ensayado.



**Figura 5.4. Representación esquemática de los parámetros de color, según el modelo cromático CIELAB (Commission Internationale d'Eclairage).**

Ángulo de tamiz o Tono (Hue°) varía de 0° a 360°; Saturación (C\*, chroma) varía de 0 a 100; Luminosidad (L\*) varía de 0 a 100.

#### 5.3.9.3. Pérdida de peso

Los frutos cosechados en el estadio de madurez Verde Maduro se pesaron para determinar su peso inicial. Los mismos frutos se pesaron cada 2 d durante 14 d. La pérdida de peso se calculó como el porcentaje de pérdida de peso respecto al peso inicial.

#### 5.3.10. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).

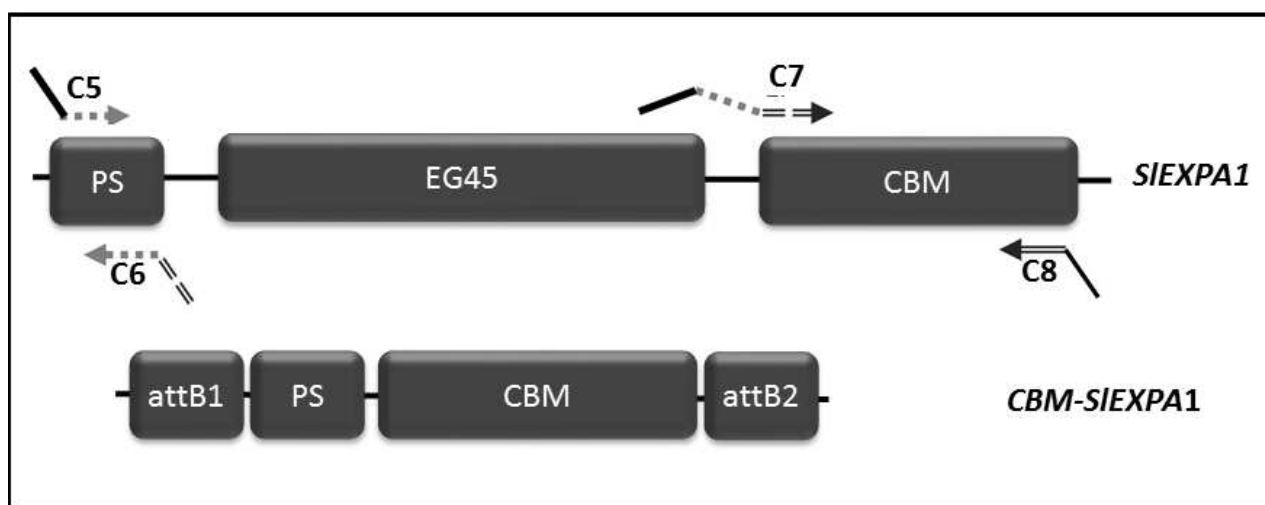


## 5.4. RESULTADOS

### 5.4.1. Clonado y transformación de plantas

El análisis bioinformático de la secuencia del gen *SIEXPA1* realizado con el programa SignalP 4.0 y la base de datos PROSITE reveló que la proteína SIEXPA1 tiene la estructura clásica de  $\alpha$ -expansinas de plantas (Cosgrove, 2000; Sampedro y col., 2006). La proteína tiene un péptido señal (SP; primeros 23 aa) en el extremo N-terminal que dirige su expresión hacia el apoplasto, un dominio catalítico putativo (42-167 aa), una corta secuencia de unión (168-176 aa), y un CBM en el extremo C-terminal (177-256 aa). Las secuencias de nucleótidos de estos elementos se delimitaron en el ADNc *SIEXPA1* y se utilizaron en el diseño de los cebadores para generar el constructo empleado en la transformación de las plantas (véase, sección 5.3.1). Una representación esquemática del gen endógeno *SIEXPA1* y el gen *CBM-SIEXPA1* recombinante se muestra en la Figura 5.5, junto con la posición de hibridación de los cebadores utilizados en la ingeniería de la construcción.

Una vez generado el constructo diseñado para la sobreexpresión constitutiva de la proteína recombinante CBM-SIEXPA1, dirigida a la pared celular por su propio péptido señal, se procedió a la transformación de las plantas de tomate (*S. lycopersicum* cv. Ailsa Craig) a través de una transformación de callos de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101). El vector binario empleado fue el pK7WG2D,1 que contiene kanamicina y GFP como genes marcadores seleccionables y un promotor del virus del mosaico del coliflor (CaMV-P35S) para la expresión constitutiva del gen de interés (véase, Figura 5.1).



**Figura 5.5. Representación esquemática de la secuencia completa de *SIEXPA1* y de la secuencia recombinante *CBM-SIEXPA1*.**

Péptido señal (PS); Dominio catalítico putativo (EG45, EXP); Dominio de unión a carbohidratos (CBM); Proteína completa de  $\alpha$ -expansina 1 de tomate, SIEXPA1. Las flechas indican la posición de pegado de los cebadores usados para generar cada construcción. Las líneas llenas (—) indican los sitios de recombinación attb1 y attb2. Cebadores usados en la PCR 1: Cebador 5(C5): sitio de recombinación attb1 y secuencia complementaria del péptido señal; Cebador 6 (C6): secuencia complementaria del CBM (líneas entrecortadas, ==) y del PS. Cebadores usados en la PCR 2: Cebador 7 (C7): Producto de PCR1; Cebador 8 (C8): sitio de recombinación attb2 y secuencia complementaria de CBM.

Once eventos de transformación independientes se obtuvieron después de la selección de cultivo de tejidos y la regeneración de plantas, de los cuales tres resultaron ser estériles. Las plantas transformadas fértiles se cultivaron durante dos generaciones, y la presencia de la expresión, a nivel de ARNm, de *CBM-SIEXPA1* se identificó en frutos en estadio Pi. Las plantas fueron clasificadas como transgénicas o acigotas en función del análisis de expresión del transgen *CBM-SIEXPA1*.

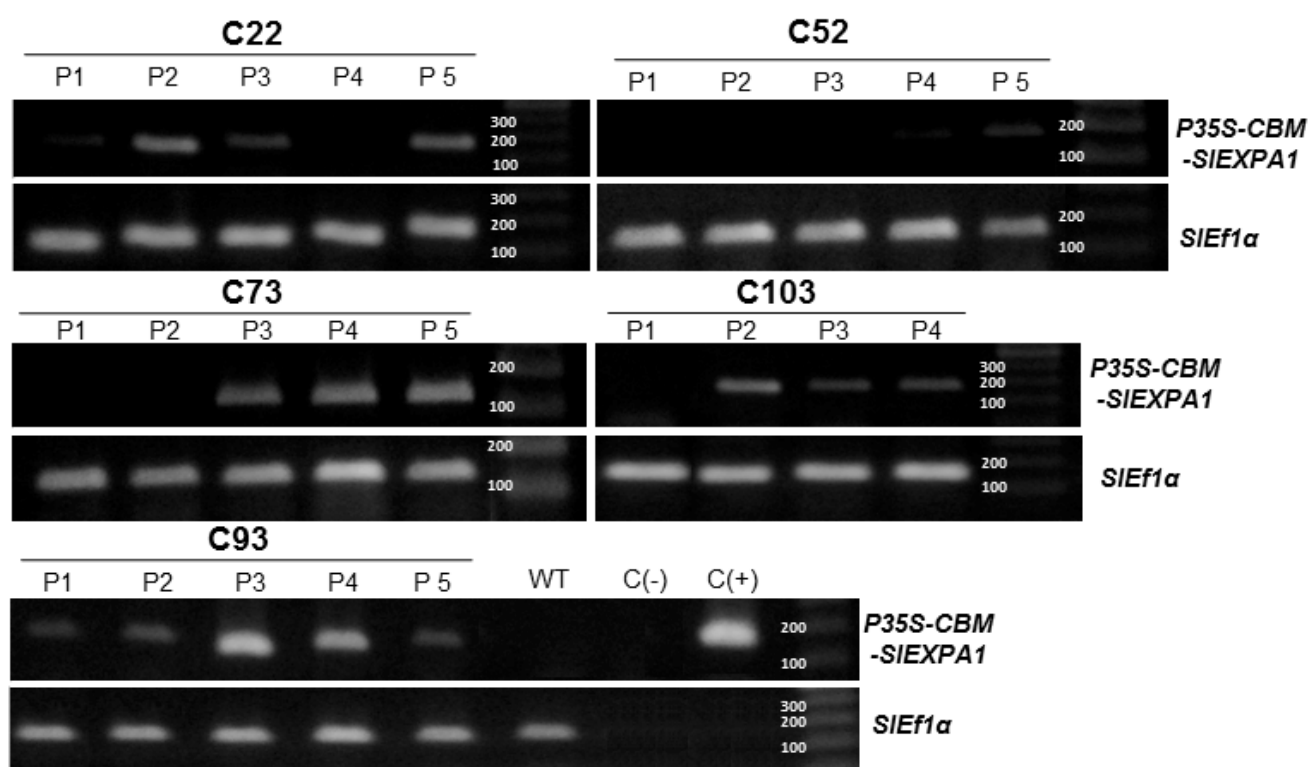
#### 5.4.2. Análisis de la expresión del ARNm del *CBM-SIEXPA1*

La expresión del ARNm de *CBM-SIEXPA1* en el fruto del tomate transgénico fue confirmada por RT-PCR utilizando un conjunto de cebadores específicos para el gen de interés. De las 24 plantas analizadas de la segunda generación, 17 resultaron

ser positivas para la expresión del mismo (C22-P1, P2, -P3, -P5; C52-P4, -P5; C73-P3, -P4, -P5; C93- P1, -P2, -P3, -P4, -P5; C103-P2, -P3 y -P4), y éstas fueron identificadas como plantas transgénicas. Las otras 7 plantas (C22-C52; P4-P1, P2; -P3; C73-P1, P2; C103-P1) se analizaron adicionalmente usando el mismo conjunto de cebadores y ADN genómico como molde para confirmar la ausencia del constructo, y fueron clasificadas como plantas acigotas. Asimismo, todas las plantas fueron analizadas por un gen de referencia.

La RT-PCR generó un amplicón de 182 pb para el gen de interés y un amplicón de 110 pb para el gen control de referencia (Figura 5.6). Aquí es importante mencionar, que el gen control de referencia (SIEf1 $\alpha$ ) fue diseñado de manera de poder discernir si el ADNc estaba o no contaminado con ADN genómico. Por ello, los mismos fueron diseñados contemplando que los cebadores pegaran sobre dos exones distintos (separados en la secuencia genómica por un intrón de 80 pb), es decir, si existiera contaminación con ADN genómico el fragmento de amplificación sería de 190 pb mientras que si el fragmento fuera producto del ADNc el fragmento sería de 110 pb. En nuestro caso, se puede observar que no se observó contaminación con ADN genómico en los chequeos observándose una única banda cercana a los 110 pb (Figura 5.6).

Con el fin de evaluar si había un efecto general debido a la sobreexpresión de la proteína CBM-SIEXPA1, las plantas individuales se clasificaron como transgénicas o acigotas basados en el análisis por RT-PCR. Esta agrupación nos permitió comparar globalmente los fenotipos de las plantas sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* (17 plantas, de 5 eventos diferentes), con el de plantas acigotas (7 plantas, de 4 eventos diferentes). Además, se incluyeron 5 plantas WT (no transformadas) como un control adicional.



**Figura 5.6. Análisis de la expresión del gen de interés (*P35S-CBM-SIEXPA1*) por RT-PCR en líneas transgénicas seleccionadas.**

C22, C52, C73, C93 y C103 indican diferentes eventos de transformación y P1 a P5 indican diferentes plantas por evento. Tipo salvaje (WT); control negativo de RT-PCR (C (-)); control positivo de RT-PCR (C (+)). Se utilizaron treinta y cinco ciclos de PCR para la amplificación de *P35S-CBM-SIEXPA1* y *SIEf1α* (gen de referencia).

#### 5.4.3. Caracterización fenotípica de las plantas sobreexpresantes de *CBM-SIEXPA1*

Con el fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión de *CBM-SIEXPA1* en el crecimiento y desarrollo de la planta, se midieron diferentes características fenotípicas en dos momentos diferentes, a los 40 y a los 60 días posgerminación (Tabla 5.1.). El análisis se realizó agrupando las plantas como se mencionó anteriormente y denominando plantas transgénicas a aquellas que expresan el gen de interés y plantas acigotas a aquellas que no lo expresan. De esta manera lo que se intentó ver es el

efecto propio de la expresión del transgen de interés dejando de lado las variaciones propias entre eventos independientes que pudieran existir.

**Tabla 5.1.** Efecto de la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* sobre el fenotipo de las plantas

Medida		WT*1		Acigota*2		Transgénica*3	
40 d	Altura (cm)	74,0	± 3,2 <sup>a</sup>	58,2	± 4,2 <sup>b</sup>	60,3	± 2,1 <sup>b</sup>
	N° de flores	7,6	± 0,4 <sup>a</sup>	4,0	± 1,8 <sup>a</sup>	3,4	± 0,9 <sup>a</sup>
	N° de racimos florales	1,0	± 0,1 <sup>a</sup>	0,3	± 0,2 <sup>ab</sup>	0,4	± 0,1 <sup>b</sup>
	SPAD	4 <sup>ta</sup> hoja	28,9 ± 0,9 <sup>ab</sup>	31,6 ± 1,5 <sup>bc</sup>	34,0 ± 1,0 <sup>c</sup>		
		5 <sup>ta</sup> hoja	35,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	37,9 ± 0,9 <sup>a</sup>	38,9 ± 0,9 <sup>a</sup>		
	Área (cm <sup>2</sup> )	4 <sup>ta</sup> hoja	150,3 ± 21,9 <sup>a</sup>	152,7 ± 15,8 <sup>a</sup>	150,1 ± 9,9 <sup>a</sup>		
		5 <sup>ta</sup> hoja	188,8 ± 25,0 <sup>a</sup>	168,5 ± 15,4 <sup>a</sup>	163,4 ± 11,0 <sup>a</sup>		
60 d	Altura (cm)	103,6	± 3,7 <sup>a</sup>	94,2	± 5,9 <sup>a</sup>	99,1	± 2,5 <sup>a</sup>
	N° de flores	23,4	± 2,8 <sup>a</sup>	16,8	± 1,5 <sup>a</sup>	20,8	± 1,7 <sup>a</sup>
	N° de racimos florales	3,0	± 0,3 <sup>a</sup>	2,5	± 0,2 <sup>a</sup>	2,8	± 0,2 <sup>a</sup>
	SPAD	4 <sup>ta</sup> hoja	26,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	26,9 ± 1,5 <sup>a</sup>	26,8 ± 1,1 <sup>a</sup>		
		5 <sup>ta</sup> hoja	31,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	31,2 ± 1,2 <sup>a</sup>	32,0 ± 1,2 <sup>a</sup>		

\* 1. Los datos corresponden a mediciones medias ± ES de cinco plantas independientes.

\* 2. Los datos corresponden a mediciones medias ± ES de siete plantas independientes.

\* 3. Los datos corresponden a mediciones medias ± ES de diecisiete plantas independientes.

Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Mismas letras indican que no hay diferencia estadística entre las plantas.

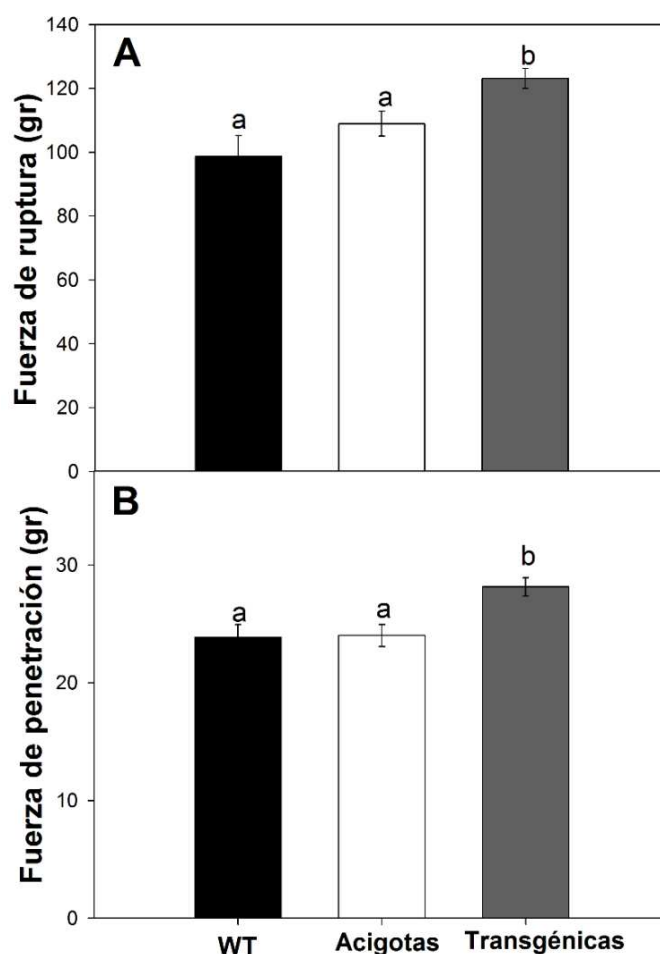
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las plantas transgénicas y acigotas en la altura de la planta, el número de flores y el número de racimos florales a los 40 o 60 d posgerminación. Sin embargo, las plantas transgénicas resultaron ser más cortas y con menor número de racimos florales desarrollados que las plantas WT a los 40 d posgerminación, pero esto no fue confirmado a los 60 d.

Respecto al contenido de clorofila de las hojas, la determinación se realizó por un método no destructivo, sobre la 4<sup>ta</sup> y 5<sup>ta</sup> hoja desde la base de la planta, haciendo uso de un medidor óptico portátil (medidor de clorofila Minolta SPAD-502). Este equipo

permite evaluar el contenido de clorofila de una hoja midiendo su absorbancia a 650 nm (luz roja), correspondiente a uno de los dos picos de absorción de la clorofila, y a 940 nm (infrarrojo), lo cual permite corregir el efecto de diferencias en el grosor de las hojas. A los 40 d posgerminación, el contenido de clorofilas en la 4<sup>ta</sup> hoja de las plantas transgénicas fue estadísticamente mayor que en las correspondientes al WT. Una tendencia similar se observó para la 5<sup>ta</sup> hoja, pero en este caso las diferencias no fueron significativas. Si nos referimos a la medida a los 60 d posgerminación, se observó que el contenido de clorofila fue menor respecto al de 40 d, para ambas hojas en las diferentes plantas ensayadas; pero no se observaron diferencias significativas en el contenido de clororofilas de las hojas 4<sup>ta</sup> o 5<sup>ta</sup> provenientes de plantas transgénicas, acigotas y WT (Tabla5.1).

Otro parámetro medido fue el área foliar de la 4<sup>ta</sup> y 5<sup>ta</sup> hoja compuesta a los 40 d posgerminación. En ambas determinaciones, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de plantas, sin embargo, resulta interesante mencionar que, para el caso de la 5<sup>ta</sup> hoja, se observó que las plantas transgénicas poseen un área foliar bastante menor a las WT y levemente menor a las acigotas (Tabla 5.1).

Por otra parte, se realizó un análisis de las propiedades mecánicas de las hojas, para lo cual se utilizaron dos tipos de medidas complementarias (Figura 5.6).



**Figura 5.7. Propiedades mecánicas de hojas provenientes de plantas WT, acigotas y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

**A)-** Fuerza máxima necesaria para romper las hojas de plantas WT, acigotas y transgénicas. **B)-** Fuerza necesaria para penetrar hojas de plantas WT, acigotas y transgénicas. Los datos corresponden a 20 mediciones por planta, expresados como valores medios  $\pm$  ES. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre hojas de plantas WT, acigotas y transgénicas.

En primer lugar, se realizó un **ensayo de extensión** de la hoja que mide la fuerza necesaria para romper una sección de 1 cm x 2 cm paralela a la nervadura central de las hojuelas terminales. Se observó un valor significativamente mayor de la fuerza de rotura en hojas de las plantas transgénicas en comparación con los controles acigotas y WT (Figura 5.7-A).

En segundo lugar, se realizó un **ensayo de penetración**, el cual mide la fuerza necesaria para penetrar la lámina de la hojuela terminal a una distancia estandarizada de un 1 cm de la nervadura central y sobre el centro de la hoja. En este caso, se determinó que la fuerza necesaria para penetrar la hojuela terminal era significativamente mayor en las plantas transgénicas (Figura 5.7-B).

#### **5.4.4. Efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre algunos parámetros de calidad del fruto (pH, acidez titulable, sólidos solubles y azúcares totales)**

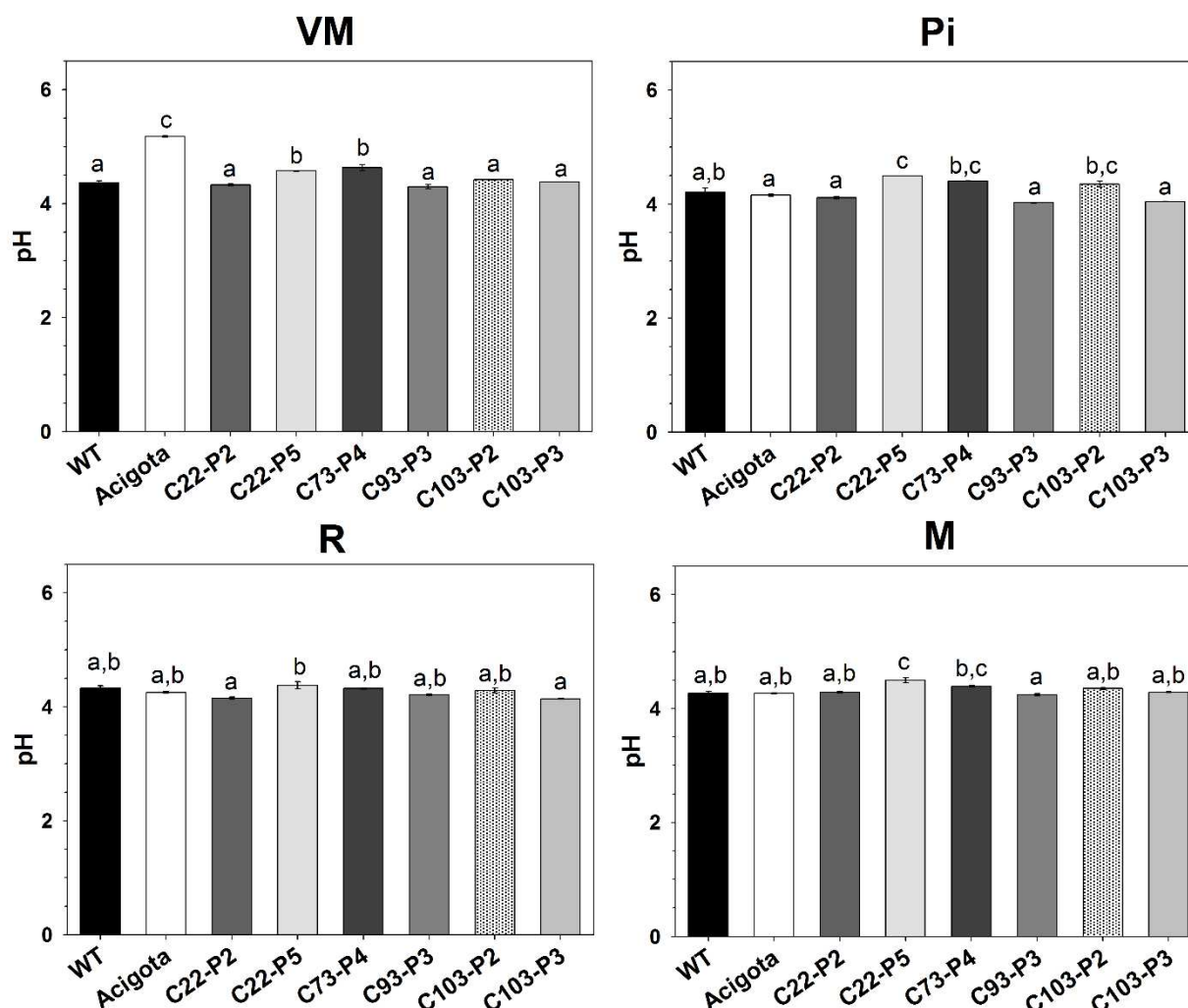
La composición química de los tomates ha sido ampliamente estudiada y se han caracterizado los principales determinantes del sabor y el aroma. Básicamente, el sabor de un fruto depende de su contenido de azúcares y ácidos; y en particular, de la relación azúcares:ácidos (Bennett, 2012).

Se seleccionó un grupo de plantas para determinar una serie de parámetros de calidad del fruto (pH, acidez titulable, sólidos solubles y azúcares totales). Para ello, se cosecharon frutos en cuatro estadios de madurez diferentes (VM, Pi, R y M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P2, C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P2 y C103-P3).

Los resultados de la medida del pH del homogenato de los frutos indicaron que el mismo se mantiene constante a medida que progresa la maduración, para los tres grupos de plantas analizados, a excepción de los frutos de la planta acigota que el pH descendió desde el estadio VM a Pi para luego mantenerse constante durante el progreso de la maduración (datos no mostrados). Un análisis pormenorizado de los resultados indica que, si bien en algunos estadios de madurez ensayados se



observaron algunas diferencias estadísticas entre los frutos control y los transgénicos, estas diferencias no son congruentes para predecir un comportamiento particular (Figura 5.8).

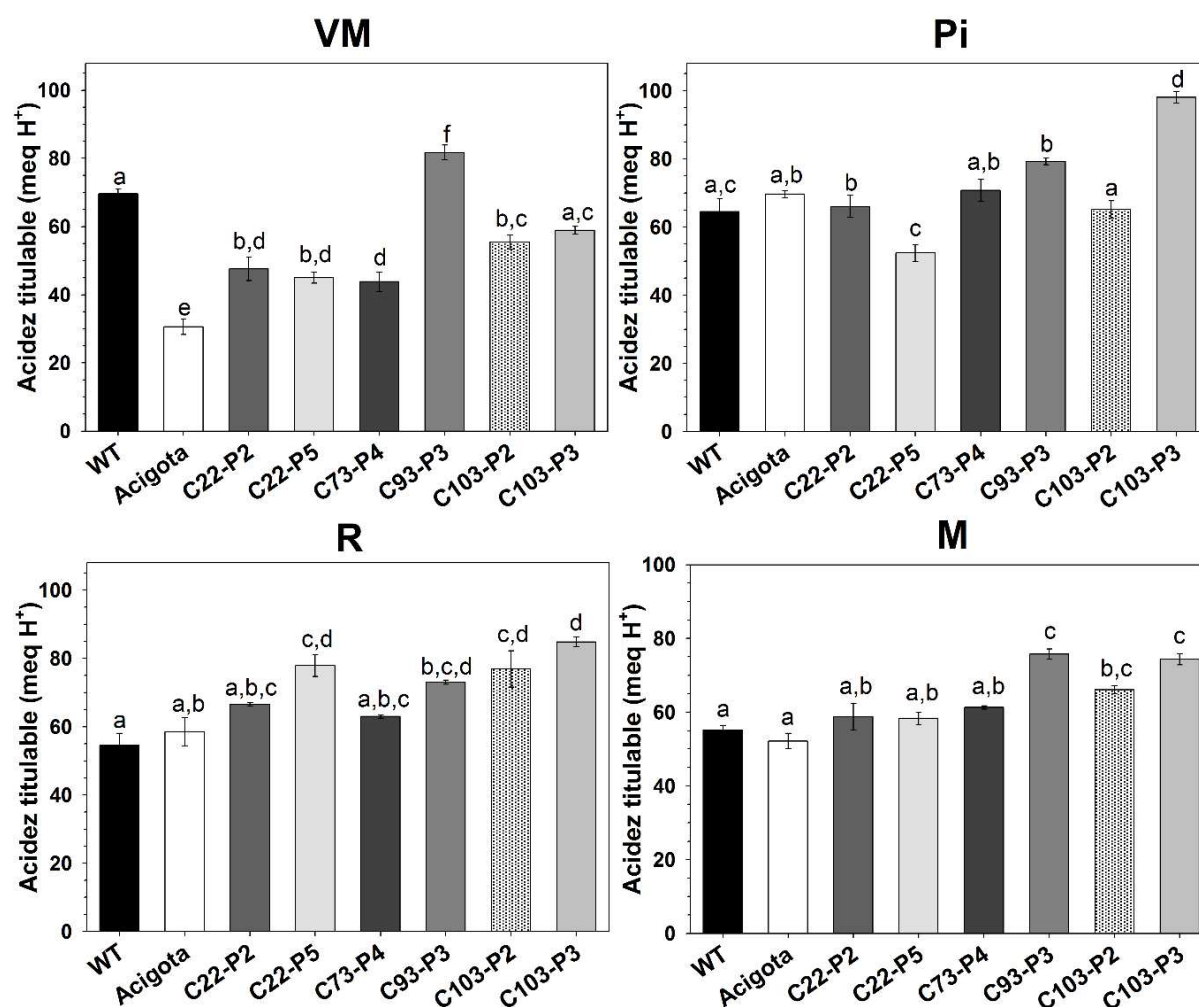


**Figura 5.8. Determinación del pH de frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* durante la maduración.**

Se obtuvieron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R) y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P2 y C103-P3). Los datos corresponden a la media de pH  $\pm$  ES de 3 determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre frutos en un mismo estadio de madurez.

Asimismo, se determinó la acidez titulable de los frutos en los 4 estadios de madurez mencionados. En caso de los frutos WT la acidez titulable disminuye a partir

del estadio VM a medida que los frutos maduran. Ahora bien, este comportamiento no se observó para los frutos acigotas o transgénicos (excepto C93-P3), sino que se observó un aumento de la acidez titulable entre los estadios VM a Pi, siendo estadísticamente relevante este aumento para los frutos de las plantas acigota, C22-P2; C73-P4 y C103-P3 (datos no mostrados), y posteriormente un descenso entre los estadios Pi y Maduro (Figura 5.9).



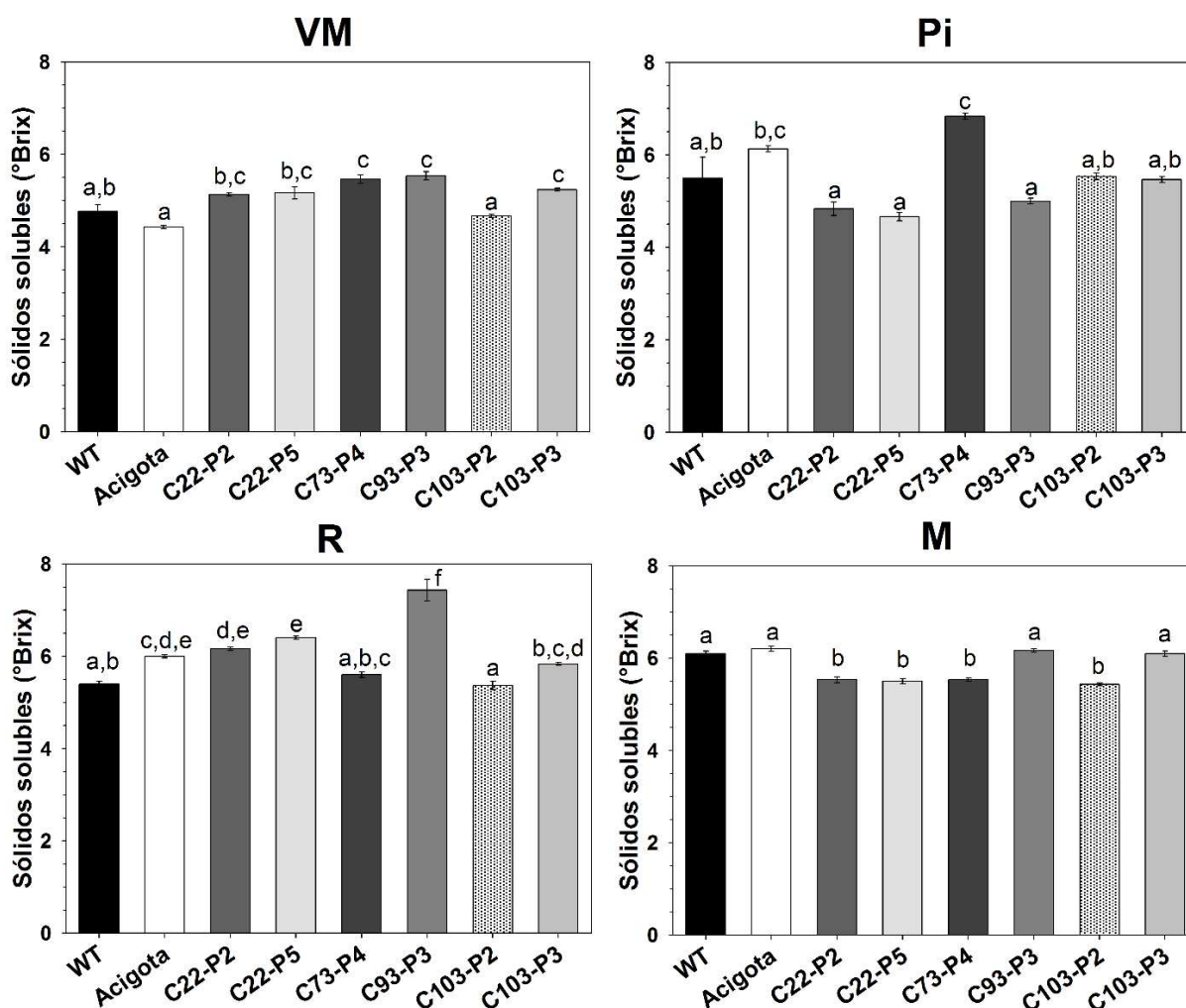
**Figura 5.9. Acidez titulable de frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1 durante la maduración.**

Se obtuvieron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R) y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P2 y C103-P3). Los datos corresponden a la media  $\pm$  ES de 3 determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre frutos en un mismo estadio de madurez.

La comparación de la acidez titulable en cada estadio de madurez particular nos muestra que en el caso del estadio VM la misma posee un comportamiento errático que no refleja ninguna tendencia general. Para el caso del estadio de madurez Pi se observa que sólo los frutos de la planta C103-P3 presentaron una acidez titulable significativamente mayor a los frutos WT y acigotas. En el estadio rojizo, los frutos de las plantas C22-P5, C103-P2 y C103-P3 presentaron una acidez titulable mayor, con relevancia estadística, respecto a frutos WT y acigota. Por último, para el estadio maduro, se observó una acidez titulable significativamente mayor en los frutos de las plantas C93-P3, C103-P2 y C103-P3 en relación con los frutos control (Figura 5.9). Independientemente del peso estadístico de los datos para los estadios de madurez Rojizo y Maduro, se observa claramente que la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* genera un retardo en la caída de la acidez titulable.

Otro parámetro analizado fue el contenido de sólidos solubles. Esta medida refleja principalmente el contenido de azúcares y ácidos orgánicos. La escala de °Brix refleja los gramos de sólidos solubles cada 100 g de líquido. En el estadio verde maduro, se observa que los frutos transgénicos presentaron un mayor contenido de SS, aunque la diferencia es estadísticamente significativa sólo para los frutos de las plantas C73-P4, C93-P3 y C103-P3. En el caso de los estadios de madurez siguientes (Pintón y Rojizo), no se observa un patrón claro de contenido diferencial de SS entre los frutos controles (WT y acigotas) y los frutos transgénicos. Por último, para el caso de los frutos en el estadio maduro, se puede observar que el contenido de SS fue menor en frutos de las plantas C22-P2, C22-P5, C73-P4 y C103-P2 (Figura 5.10). Dado que el contenido de SS aumenta durante la maduración del fruto, es plausible asumir que estas diferencias sean debidas a un retardo de la maduración. Si cotejamos estos resultados

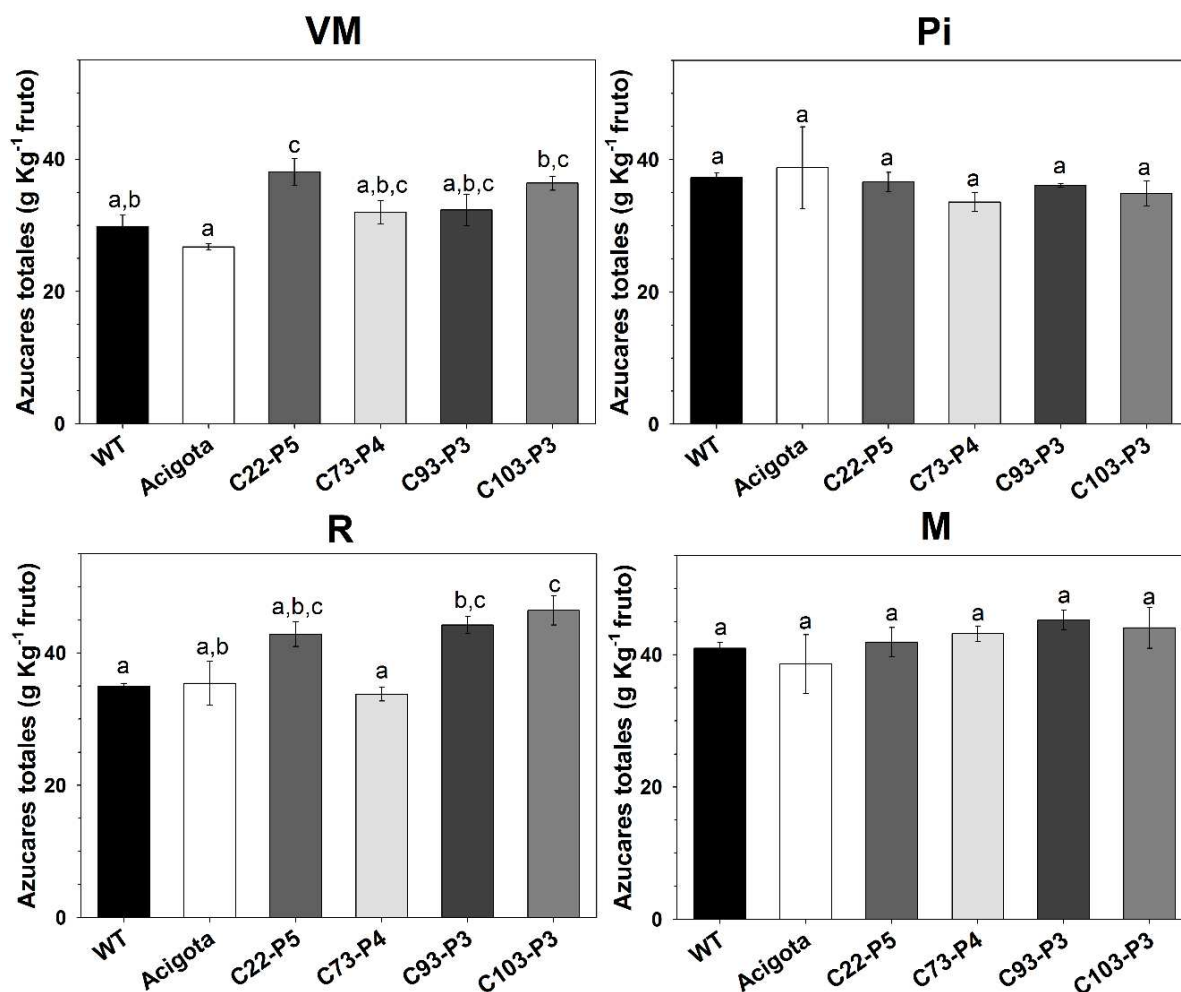
con los obtenidos para acidez titulable en este estadio de madurez (maduro), donde todos los frutos transgénicos presentan una tendencia a tener mayor acidez titulable, siendo estadísticamente significativa para las plantas C93-P3, C103-P2 y C103-P3, se podría presumir que la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* estaría retardando la maduración de los frutos en planta.



**Figura 5.10. Contenido de sólidos solubles de frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* durante la maduración.**

Se obtuvieron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R) y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P2 y C103-P3). Los datos corresponden a la media de sólidos solubles (expresados como °Brix)  $\pm$  ES de 3 determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre frutos en un mismo estadio de madurez.

Dado los resultados obtenidos para el caso de los sólidos solubles, se procedió a analizar el contenido de azúcares totales. En este caso se analizó el contenido sobre los cuatro estadios de madurez (VM, Pi, R y M) de frutos control (WT y acigota, C22-P4) y 4 plantas transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3).



**Figura 5.11. Contenido de azúcares totales de frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* durante la maduración.**

Se obtuvieron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R) y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los datos corresponden a la media de azúcares totales (expresados como g Kg<sup>-1</sup> fruto) ± ES de 3 determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un p < 0,05. Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

El contenido de azúcares totales en los frutos de las plantas controles aumentó entre los estadios VM a Pi, y luego permaneció prácticamente constante. Para el caso

de los frutos transgénicos, no se observaron grandes variaciones en el contenido de azúcares totales durante los estadios de madurez. En el estadio VM se pudo observar que sólo los frutos de C22-P5 presentaron un contenido de azúcares mayor. En el estadio Pi no se observaron diferencias estadísticas en el contenido de azúcares, mientras que en el estadio R sólo los frutos de las plantas C103-P3 presentaron un contenido de azúcares superior. Por último, un análisis del estadio maduro reveló que las plantas transgénicas no presentan diferencias estadísticas en el contenido de azúcares totales con los controles (WT, acigota) (Figura 5.11).

#### **5.4.5. Efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre la susceptibilidad a la infección por *Botrytis cinerea***

A fines de evaluar si la sobreexpresión de *CBM-SIEXPA1* en la pared celular altera la susceptibilidad del fruto de tomate a las infecciones por *B. cinerea*, se hizo un trabajo en colaboración con las Dras. Natalia Villarreal y María Marina, del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de Chascomús (IIB-INTECH).

En primer lugar, se realizó un ensayo *in vivo*, es decir sobre el fruto en fresco. Para ello, frutos en 4 estadios de madurez distintos (VM, Pi, R y M) de plantas control (WT) una acigota (C22-P4) y seis plantas transgénicas (C22-P2; C22-P5; C73-P4; C93-P3; C103-P2 y C103-P3) fueron cosechados e inoculados en sitios no heridos con conidios del hongo. Siete días después de la inoculación (dpi), los frutos de los estadios VM, Pi y R no mostraron síntomas visibles de la infección. Sin embargo, en el caso de inoculaciones realizadas sobre frutos maduros, las lesiones fueron visibles desde el primer día después de la inoculación, aunque se observó una reducción de los

síntomas de infección en los frutos maduros de C73-P4, C93-P3 y C103-P3 en comparación con frutos WT y acigotas (Perini y col., 2017).

Por otro lado, se realizó un ensayo *in vitro* donde se evaluó el crecimiento de *B. cinerea* en placas de agar que contenían material de la pared celular (RIAs) de los frutos transgénicos y control (WT y acigotas), mencionados anteriormente, como la única fuente de carbono. Después de 72 h, el crecimiento radial de *B. cinerea* en placas que contenían RIAs de plantas transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P2 y C103-P3) fue menor que el correspondiente al de los controles (WT y acigotas) (Perini y col., 2017).

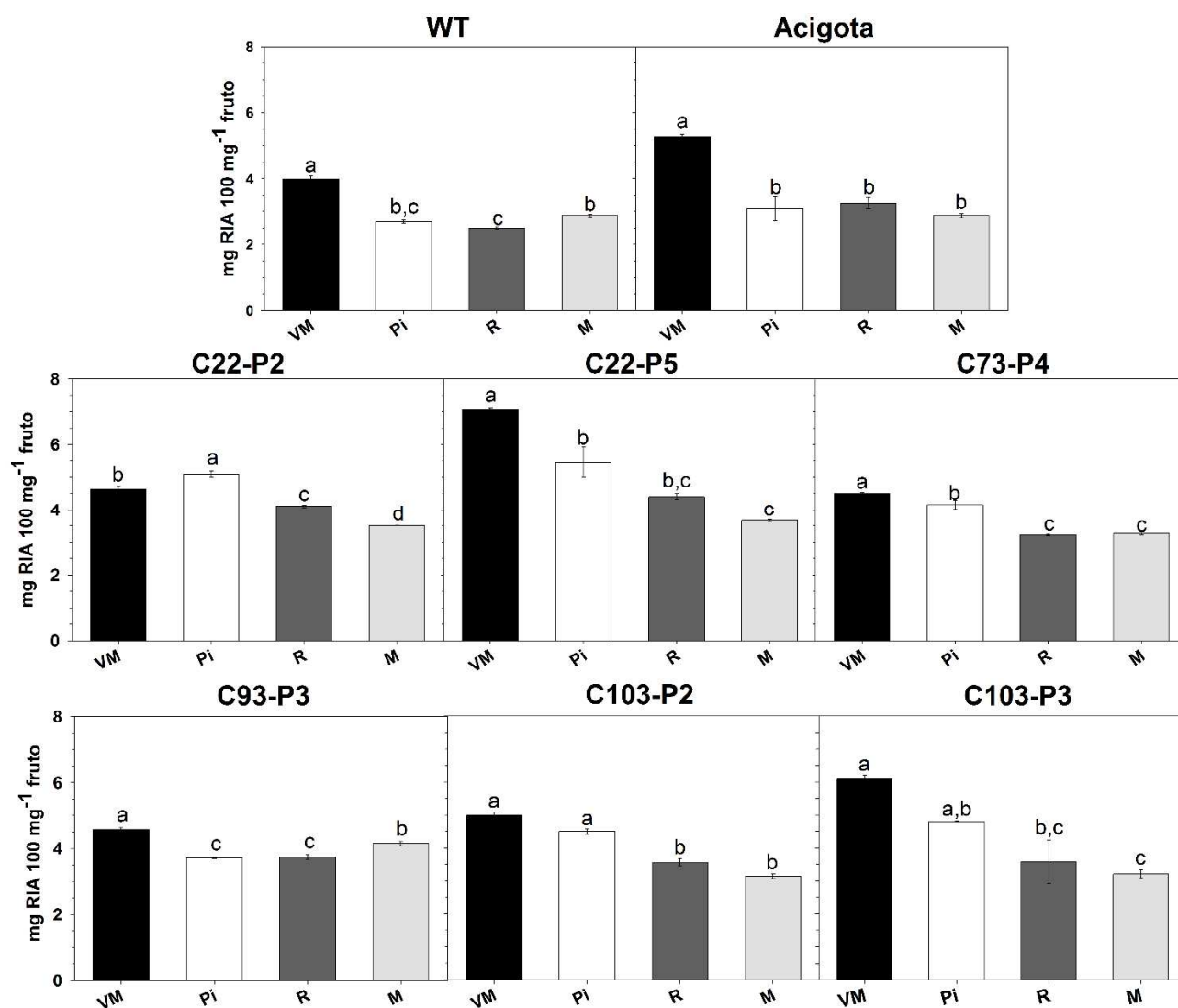
#### **5.4.6. Efecto de la sobreexpresión del CBM-SIEXPA1 en el contenido de pared celular**

El aislamiento de los residuos insolubles en alcohol (RIA) permite evaluar el contenido total de la pared celular de un tejido, mientras que la posterior extracción secuencial del mismo con distintas soluciones permite estimar la cantidad de cada componente de la pared en base a su solubilidad diferencial (Brummell, 2006). Primeramente, para aislar las paredes celulares, los frutos de tomate fueron sometidos a una extracción con etanol absoluto en ebullición a reflujo. Debido a que los polímeros permanecen insolubles en estas condiciones, el sólido resultante está compuesto fundamentalmente por las paredes celulares presentes en el tejido tratado.

Para analizar el contenido de pared, se obtuvieron los RIA a partir de frutos cosechados en 4 estadios de madurez (VM, Pi, R y M) de plantas WT, acigota (C22-P4)

y de seis plantas transgénicas (C22-P2; C22-P5; C73-P4; C93-P3; C103-P2 y C103-P3).

En el caso de frutos carnosos, como el tomate, el contenido de RIA disminuye a medida que los frutos maduran. En nuestro análisis, este comportamiento fue observado para los frutos de todas las plantas ensayadas (Figura 5.12).



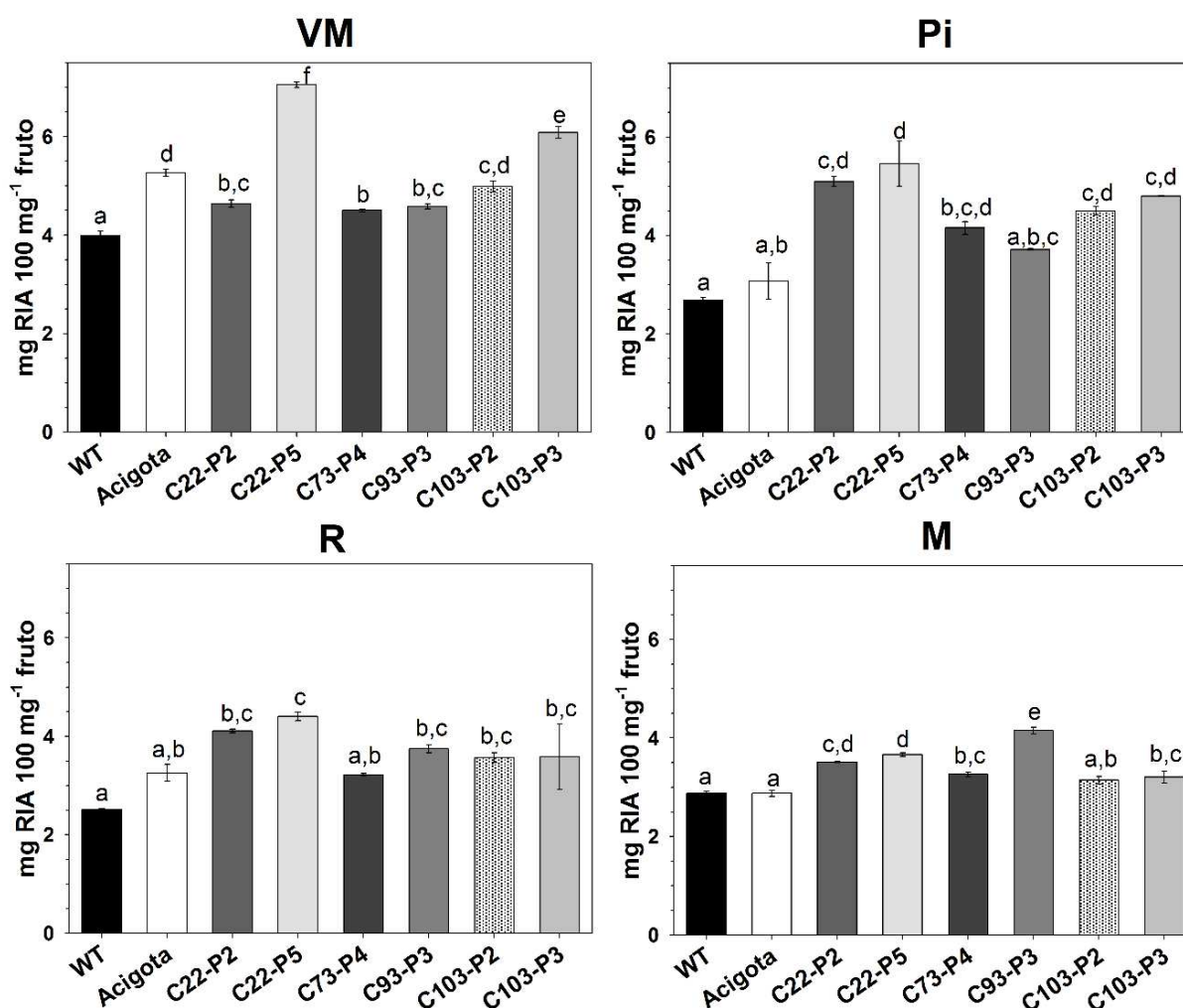
**Figura 5.12. Variación del RIA en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1.**

Los residuos insolubles alcohol (RIAs) se obtuvieron de frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5; C73-P4; C93-P3; C103-P2 y C103-P3). Los datos corresponden al contenido medio de RIA  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.



Para el caso de los frutos controles, se observó que el contenido de RIA disminuyó del estadio VM a Pi para luego mantenerse constante en los siguientes estadios de madurez. En el caso de las plantas transgénicas, a excepción de los frutos de la planta C93-P3 la cual presentó un descenso muy leve, se observó que el descenso en el contenido de RIA fue más escalonado e incluso en algunos casos el descenso se observó a partir del estadio Pi (C22-P2, C103-P2, C103-P3) (Figura 5.12).

Ahora bien, si se observa el análisis realizado en la figura 5.13, donde se comparan los RIAs de los diferentes frutos por estadio de madurez, podemos observar que, en el estadio de madurez verde maduro, el contenido de RIA de todos los frutos transgénicos fue mayor que el de los frutos WT, mientras que los resultados no fueron tan contundentes al comparar los frutos transgénicos y acigotas. Para este caso, el contenido de RIA fue mayor solamente para los frutos de las plantas C22-P5 y C103-P3. En el caso del estadio de madurez pintón, se observó en las plantas transgénicas una tendencia a producir frutos con mayor contenido de RIA que ambos controles; esta diferencia fue además significativa para frutos de cuatro líneas (C22-P2, C22-P5, C103-P2 y C103-P3) (Figura 5.13). En el estadio Rojizo, nuevamente se observó que el contenido de RIA de los frutos de las plantas transgénicas (excepto la C73-P4) fue mayor que el de los frutos WT; respecto a la comparación con el acigota, nuevamente los transgénicos tienden a tener mayor contenido de RIA, pero la diferencia es significativa solamente para los frutos de la planta C22-P5. Por último, para el caso del estadio de madurez más avanzado (Maduro), se observó un marcado retardo en la pérdida del contenido de RIA. Los frutos de 5 de las 6 plantas transgénicas estudiadas presentaron un mayor contenido de RIA con significancia estadística respecto a los controles (WT, acigota) (Figura 5.13).



**Figura 5.13. Variación del RIA dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Los residuos insolubles alcohol (RIAs) se obtuvieron de frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P2; C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P2 y C103-P3). Los datos corresponden al contenido medio de RIA  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

#### 5.4.6.1. Efecto de la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* sobre las fracciones de pared celular

Una vez caracterizado el contenido total de pared celular a través del contenido de residuos insolubles en alcohol (RIA) se decidió realizar un fraccionamiento de dicho residuo para determinar si existían diferencias en la composición de los mismos. Este

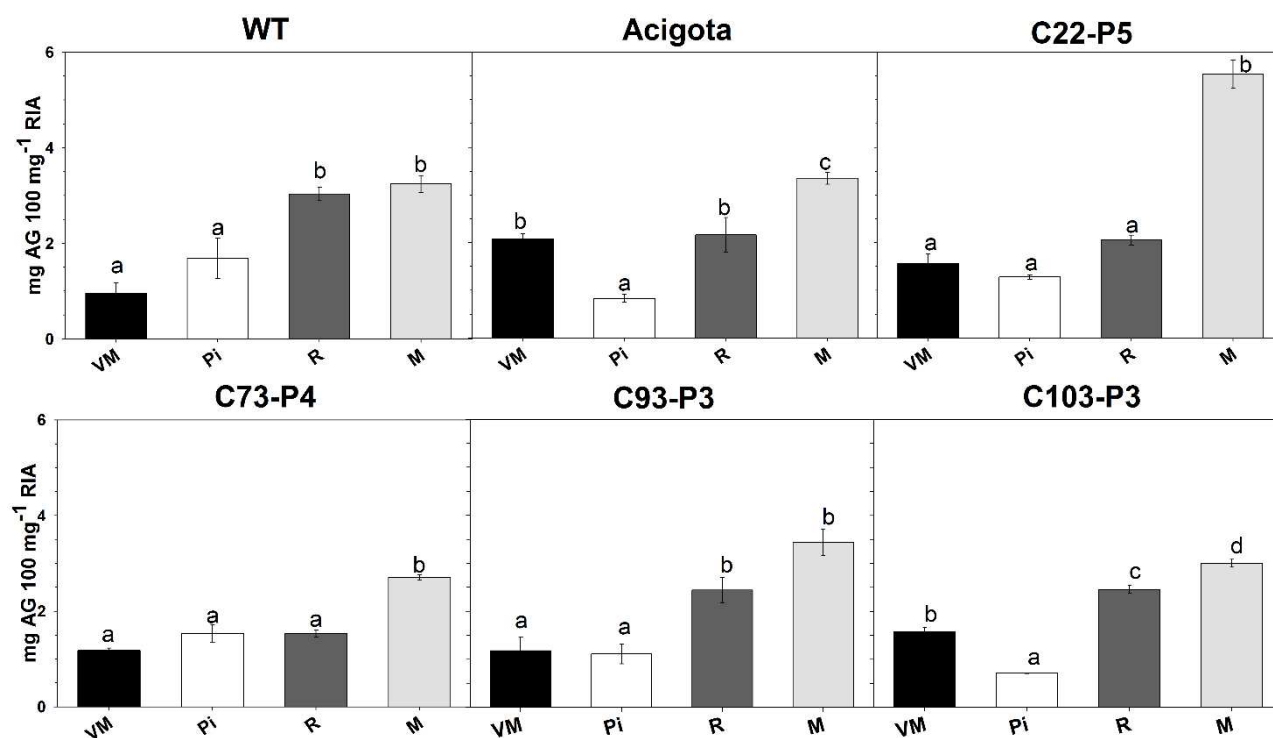
análisis se realizó sobre frutos en cuatro estados de madurez fisiológica (VM, Pi, R, M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y cuatro plantas transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3, C103-P3).

Dado que el almidón (carbohidrato de reserva no componente de la pared celular vegetal) también se mantiene insoluble durante el proceso de extracción etanólica, primero se realizó un paso de extracción del almidón con DMSO (véase, sección 5.3.8), para eliminar posibles interferencias en la cuantificación del contenido de las fracciones posteriores. Luego, el RIA se fraccionó en pectinas de interacciones débiles (fracción enriquecida en pectinas solubles en agua, PSA), pectinas con interacción a través de puentes de  $\text{Ca}^{+2}$  (pectinas solubles en EDTA, PSE); pectinas unidas por enlaces covalentes (fracción enriquecida en pectinas solubles en HCl, PSH); hemicelulosas débil y fuertemente unidas (fracción enriquecida en hemicelulosas), y finalmente celulosa. Es importante aclarar que esta marcha de extracción permite la obtención de fracciones enriquecidas en cierto tipo particular de moléculas, pero pueden contener pequeñas cantidades de otros polímeros, por lo que en realidad consisten en mezclas de distintos polímeros coextraídos (Brummell, 2006).

#### ✓ Pectinas solubles en agua (PSA)

Del análisis de los perfiles de variación del contenido de PSA durante la maduración de los frutos, se puede observar que en tomate dichas pectinas aumentan con la maduración (Figura 5.14). Para el caso de los frutos de las plantas WT se observó que el aumento se generó entre los estadios Pi a R. Para el caso de los frutos de las plantas acigotas, se observó un comportamiento distinto, observándose un descenso entre el estadio VM a P, para luego, sí incrementarse el contenido de PSA

hacia el estadio de madurez M. En el caso de los frutos de las plantas transgénicas, C22-P5 y C73-P4, se observó que el aumento de PSA se generó entre los estadios R a M, mientras que las otras dos plantas analizadas presentaron patrones de variación similares a los controles (WT, acigota) (Figura 5.14).

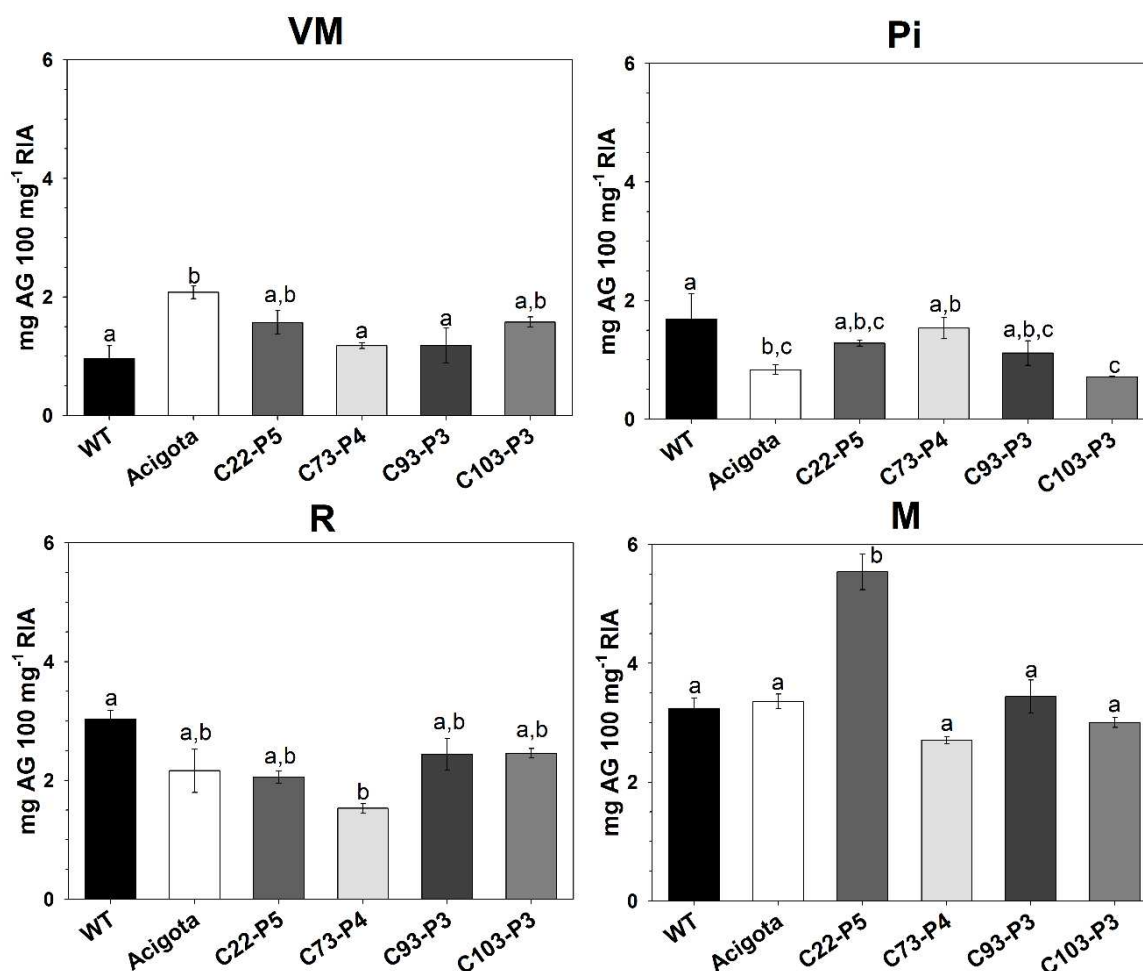


**Figura 5.14. Variación del contenido de PSA en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas solubles en agua (mg AG 100 mgr<sup>-1</sup> RIA)  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

Ahora bien, si analizamos el contenido de PSA para cada estadio de madurez en particular (Figura 5.15), se observó que en los estadios de madurez VM, Pi y R no existen diferencias significativas entre los frutos de las plantas control (WT, acigota) y los frutos de las plantas transgénicas. En el caso del estadio de madurez M, sólo se

observó un aumento significativo del contenido de PSA para los frutos de la planta C22-P5. P5.



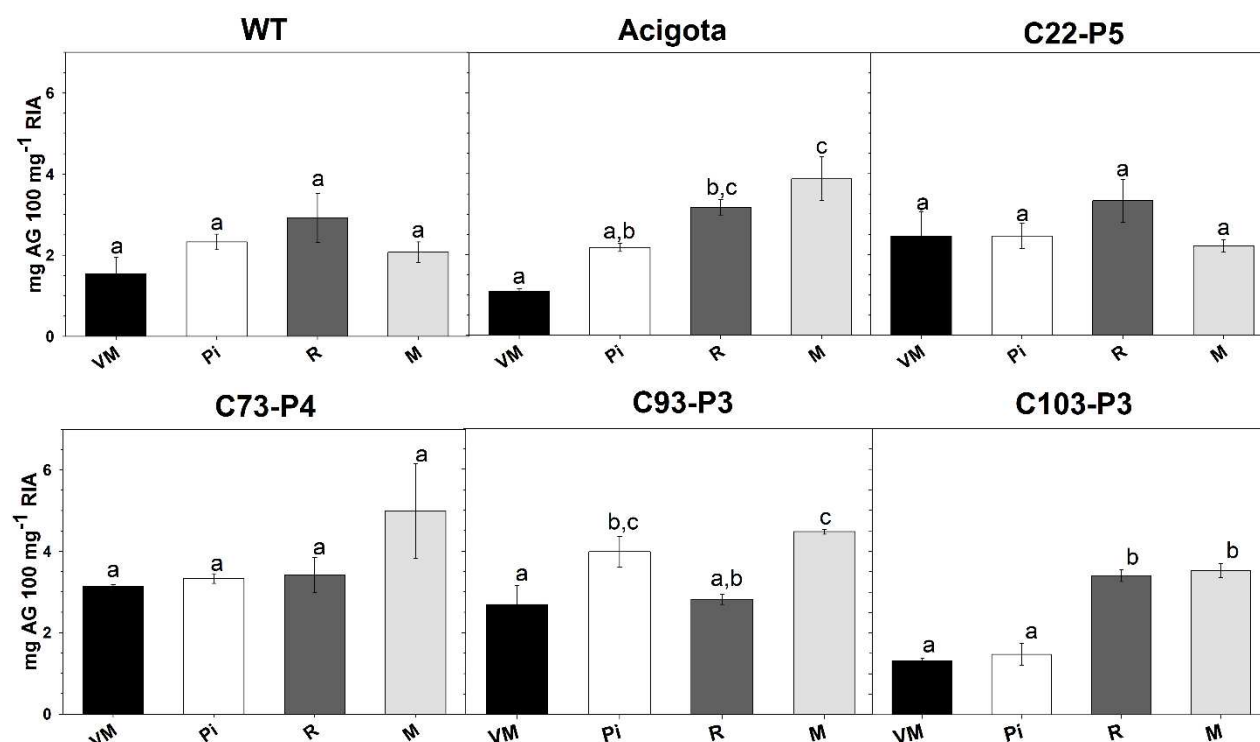
**Figura 5.15. Variación del contenido de PSA dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas solubles en agua (mg AG 100 mgr<sup>-1</sup> RIA)  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

#### ✓ Pectinas solubles en EDTA (PSE)

Esta fracción de pectinas está enriquecida en las pectinas que se encuentran unidas por puentes de Ca<sup>+2</sup>. El tratamiento con un agente quelante como lo es el EDTA,

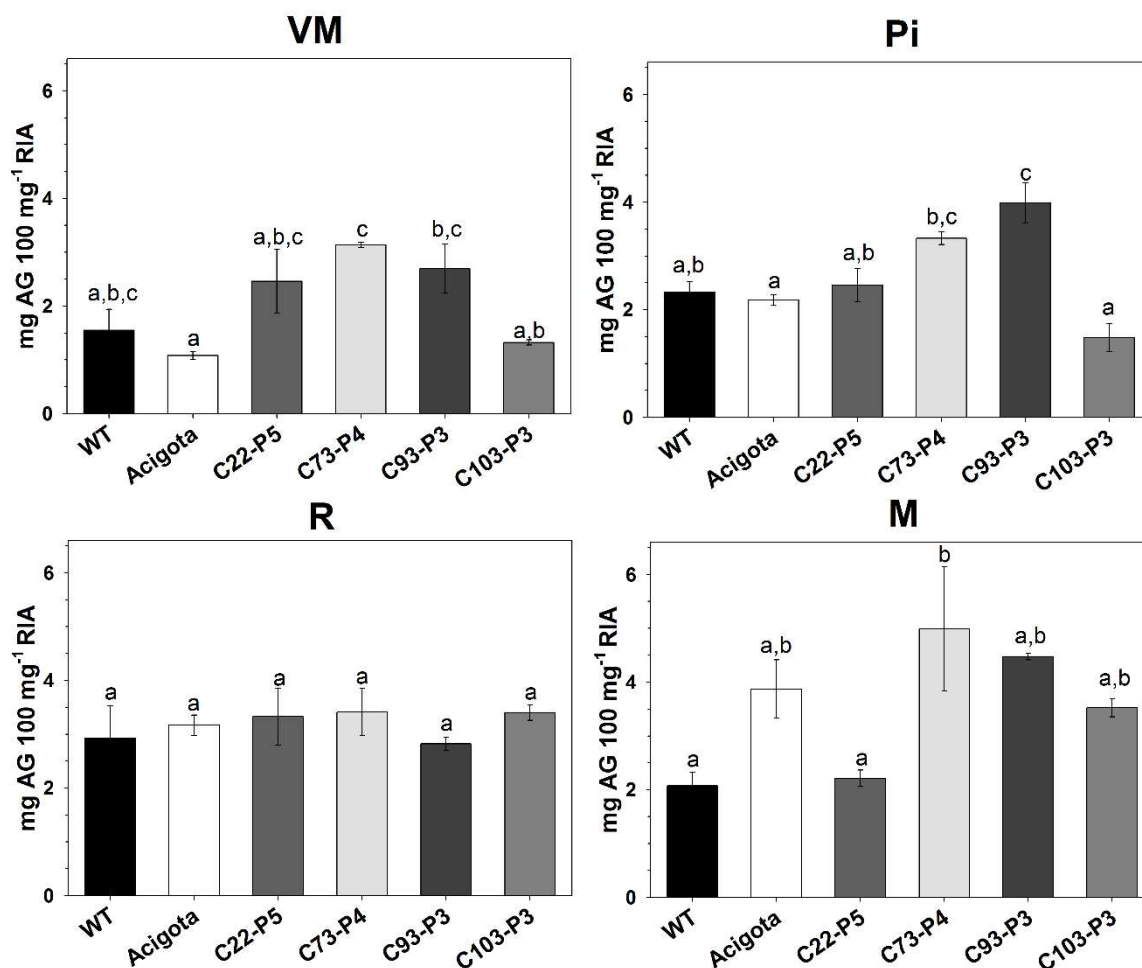
secuestra a los cationes y libera este tipo de pectinas. Del análisis de perfil de variación del contenido de PSE, se observa que para el caso de los frutos de las plantas WT, no varía durante la maduración. Esto no se observa para el caso de los frutos de las plantas acigotas, en las cuales el contenido de PSE presentó un aumento durante la maduración. Si nos referimos a las plantas transgénicas, las mismas no poseen un perfil de variación homogéneo. Para el caso de los frutos de las plantas C22-P5 y C73-P4 se observó que el contenido de PSE fue invariante durante la maduración, mientras que en los frutos de las plantas C93-P3 y C103-P3 se observó un ligero aumento en el contenido de las PSE a medida que los frutos maduran (Figura 5.16)



**Figura 5.16. Variación del contenido de PSE en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas solubles en EDTA (mg AG 100 mgr<sup>-1</sup> RIA) ± ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

Por otra parte, en la Figura 5.17 se analiza el contenido de PSE dentro de un mismo estadio de madurez. En los estadios VM y Pi los frutos transgénicos (excepto C103-P3) presentaron un contenido de PSE mayor, aunque no resulta ser estadístico respecto a los controles (WT, acigota). En el estadio Rojizo se observó claramente que el contenido de PSE fue similar en todos los frutos ensayados. Por último, en el estadio Maduro, se observó que los frutos de las plantas transgénicas (excepto C22-P5) presentaron un contenido de PSE mayor, aunque sin relevancia estadística (Figura 5.17).



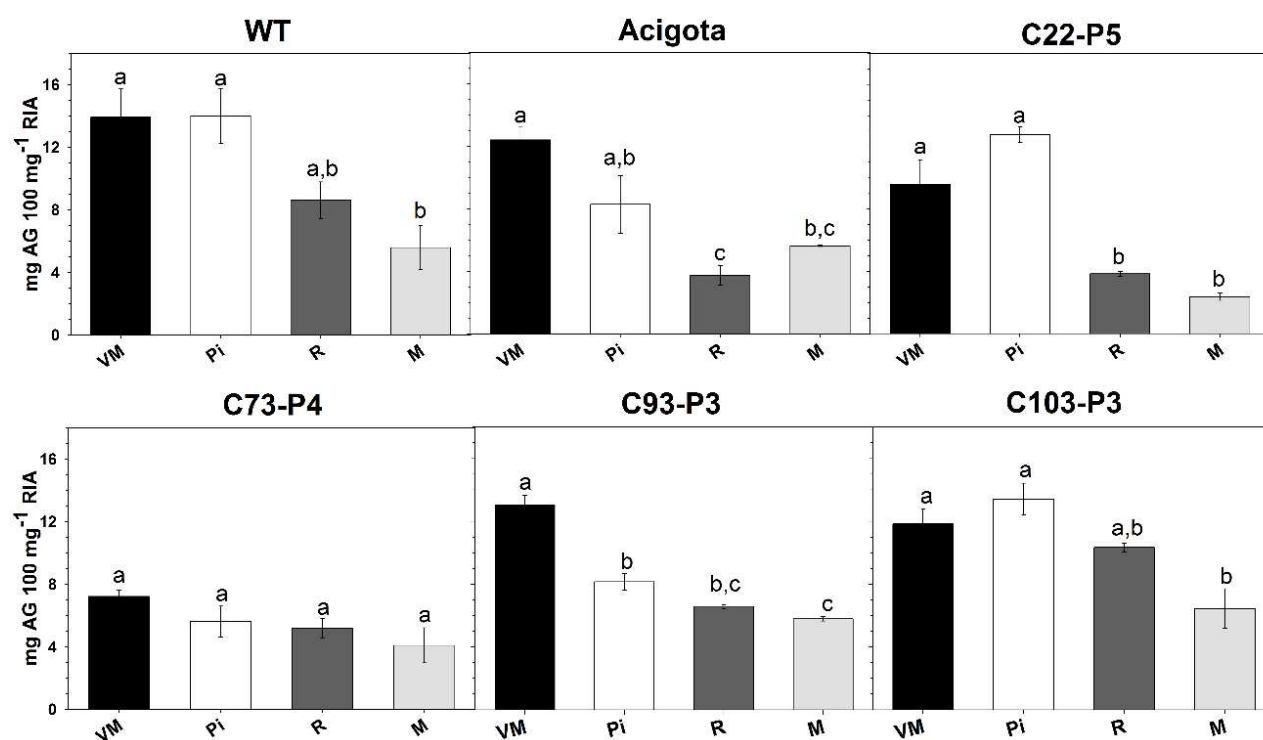
**Figura 5.17. Variación del contenido de PSE dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se

expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas solubles en EDTA ( $\text{mg AG } 100 \text{ mgr}^{-1} \text{ RIA}$ )  $\pm$  SE de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

✓ Pectinas solubles en HCl (PSH)

El último fraccionamiento de pectinas que se realizó fue el de pectinas solubles en HCl (PSH). Esta fracción está enriquecida en pectinas que se encuentran unidas por interacciones covalentes a otros polímeros. Del análisis de los resultados obtenidos, se observó que la fracción enriquecida en PSH disminuye a lo largo de la maduración (Figura 5.18) a excepción de los frutos de las plantas transgénicas C73-P4.

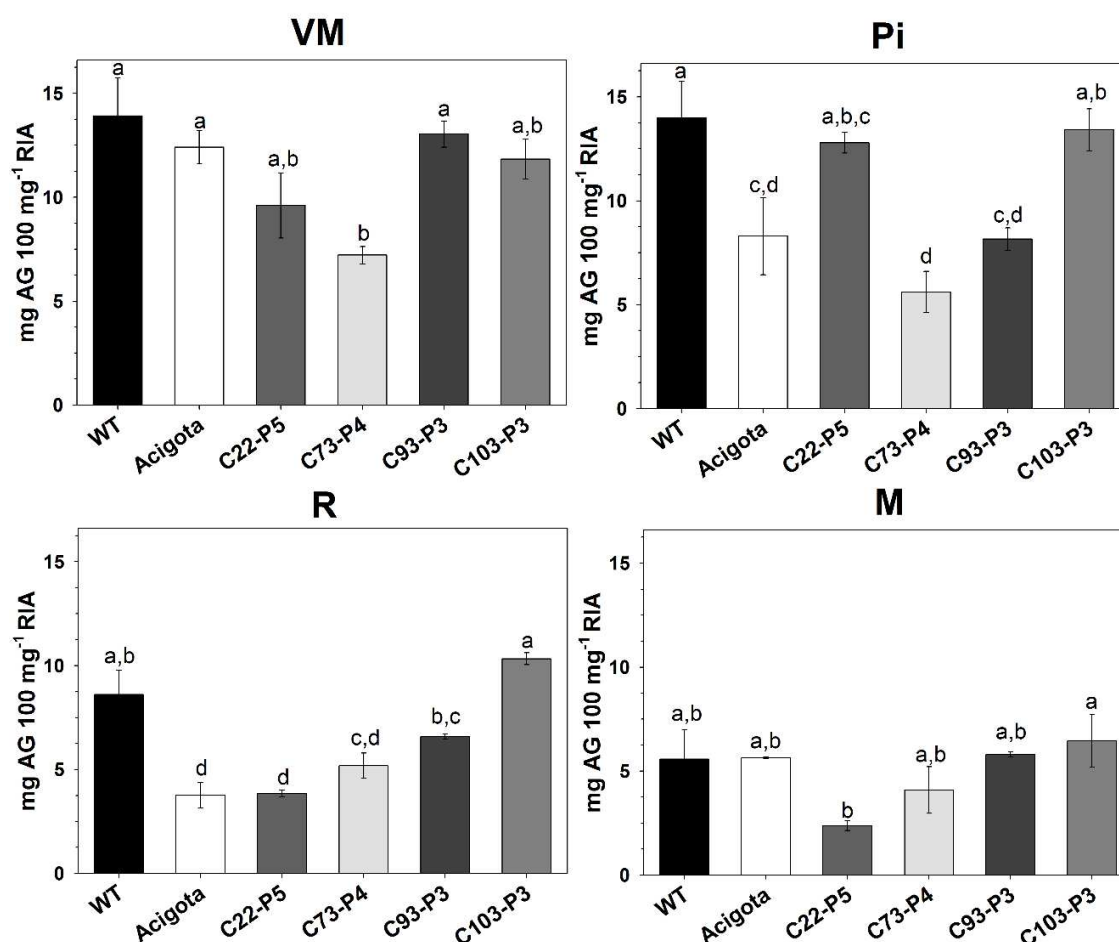


**Figura 5.18. Variación del contenido de PSH en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas solubles en HCl ( $\text{mg AG } 100 \text{ mgr}^{-1} \text{ RIA}$ )  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.



Del análisis de la comparación del contenido de PSH para cada estadio de madurez en particular que se muestra en la Figura 5.19, se observa que básicamente en ninguno de los 4 estadios de madurez ensayados hay diferencias estadísticamente relevantes entre los controles (WT y acigota) y los frutos de las plantas transgénicas a excepción de la planta C73-P4, en el estadio VM, que presentó un contenido de PSH menor a los controles (Figura 5.19).

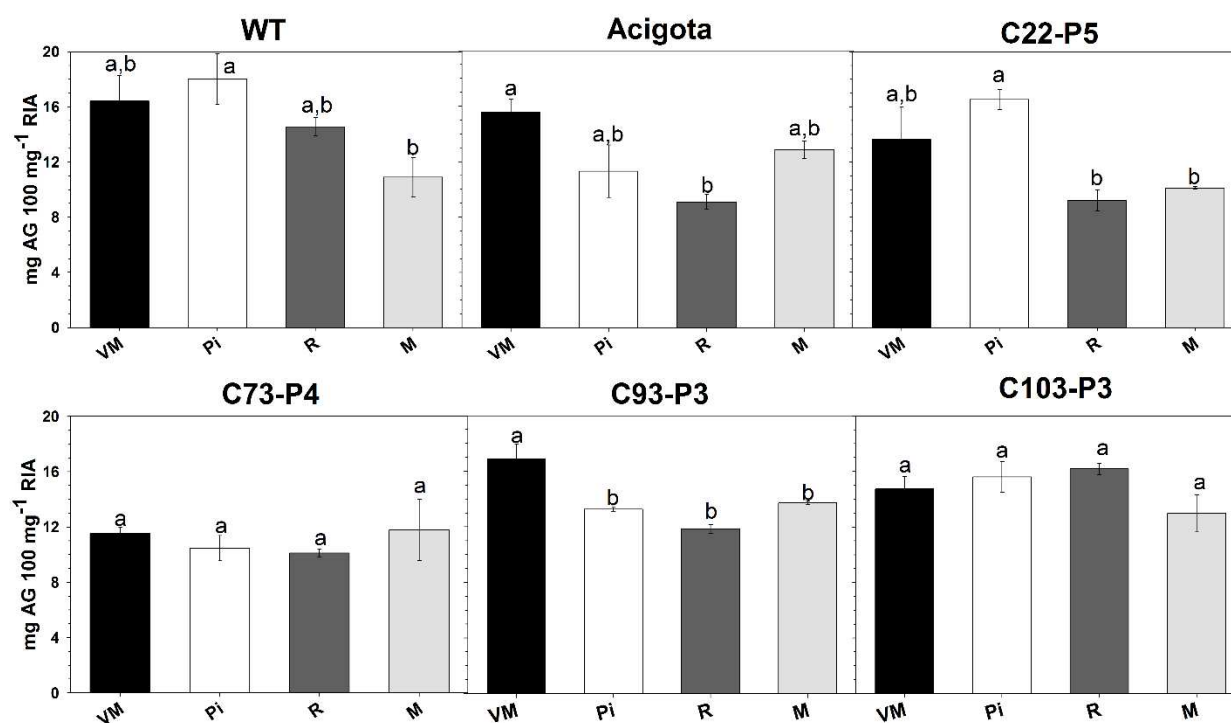


**Figura 5.19. Variación del contenido de PSH dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas solubles en HCl (mg AG 100 mgr<sup>-1</sup> RIA) ± SE de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

## ✓ Pectinas totales

El contenido de pectinas totales se evaluó a través de la suma de los valores medios de cada una de la fracción de pectinas obtenidas (PSA, PSE y PSH). Como se puede observar en la Figura 5.20, el contenido de pectinas totales para los frutos de las plantas controles (WT, acigotas) decae a medida que avanza la maduración del fruto, sin embargo, esta tendencia no resulta ser estadística para el caso de la planta acigota. Para el caso de los frutos de las plantas transgénicas, en dos de los casos (C74-P3, C103-P3), se observó que el contenido de pectinas totales se mantuvo invariante durante la maduración, mientras que en los dos restantes dicho contenido descendió. En el caso de los frutos de la planta C93-P3 se observó un descenso entre el estadio VM a Pi, pero luego se mantuvo constante. En el caso de la planta C22-P5 el descenso se observó entre el estadio Pi a R (Figura 5.20).



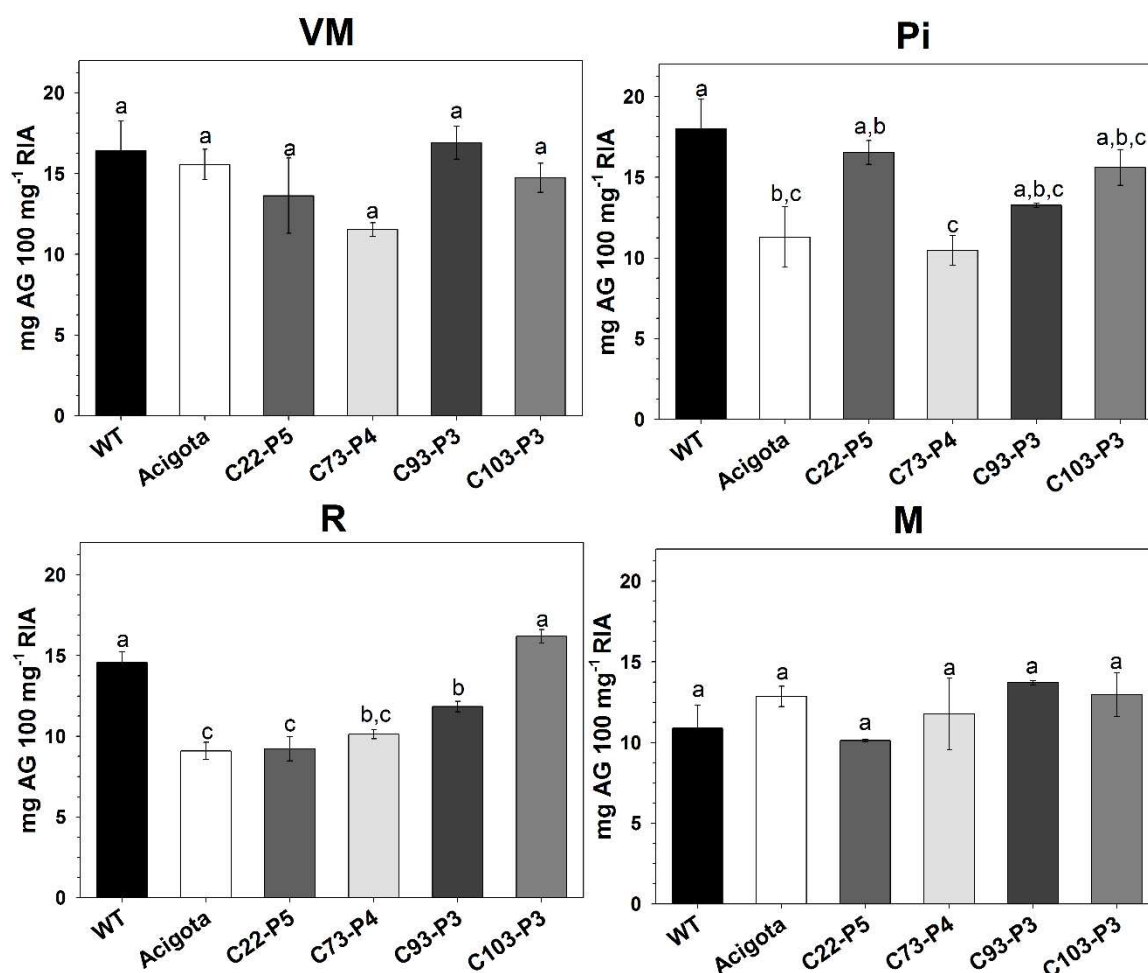
**Figura 5.20. Variación del contenido de pectinas totales en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del CBM-SIEXPA1.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se

expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas totales (mg AG 100 mgr<sup>-1</sup> RIA)  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

El descenso en el contenido total de pectina es habitual en frutos carnosos y está fuertemente asociado a la contribución dada por las PSH (unidas más fuertemente), ya que es la única fracción que en general disminuye durante la maduración. Las PSA aumentan durante este período y las PSE se mantienen bastante estables o aumentan ligeramente. Estas variaciones, que se observan en nuestros resultados, se asocian con el dismantelamiento que sufre la pared celular vegetal durante la maduración del fruto. Además de disminuir el contenido de pectinas, la proporción de las PSA y PSE aumentan, con lo cual se genera una pared más soluble.

Por otra parte, del análisis de los resultados del contenido de pectinas totales para cada estadio de madurez, podemos observar que tanto el estadio Verde Maduro como el Maduro, no presentaron diferencias estadísticas entre los controles y los frutos de las plantas transgénicas (Figura 5.21). Para el caso de los otros dos estadios de madurez intermedios (Pintón y Rojizo), se observa en ambos casos diferencias entre los controles, con lo cual se dificulta en potencial análisis en los contenidos de las plantas transgénicas, ya que las mismas poseen valores intermedios. En sí, este análisis no nos permite dilucidar con claridad si existe una alteración en el contenido total de pectinas.



**Figura 5.21. Variación del contenido de pectinas totales dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

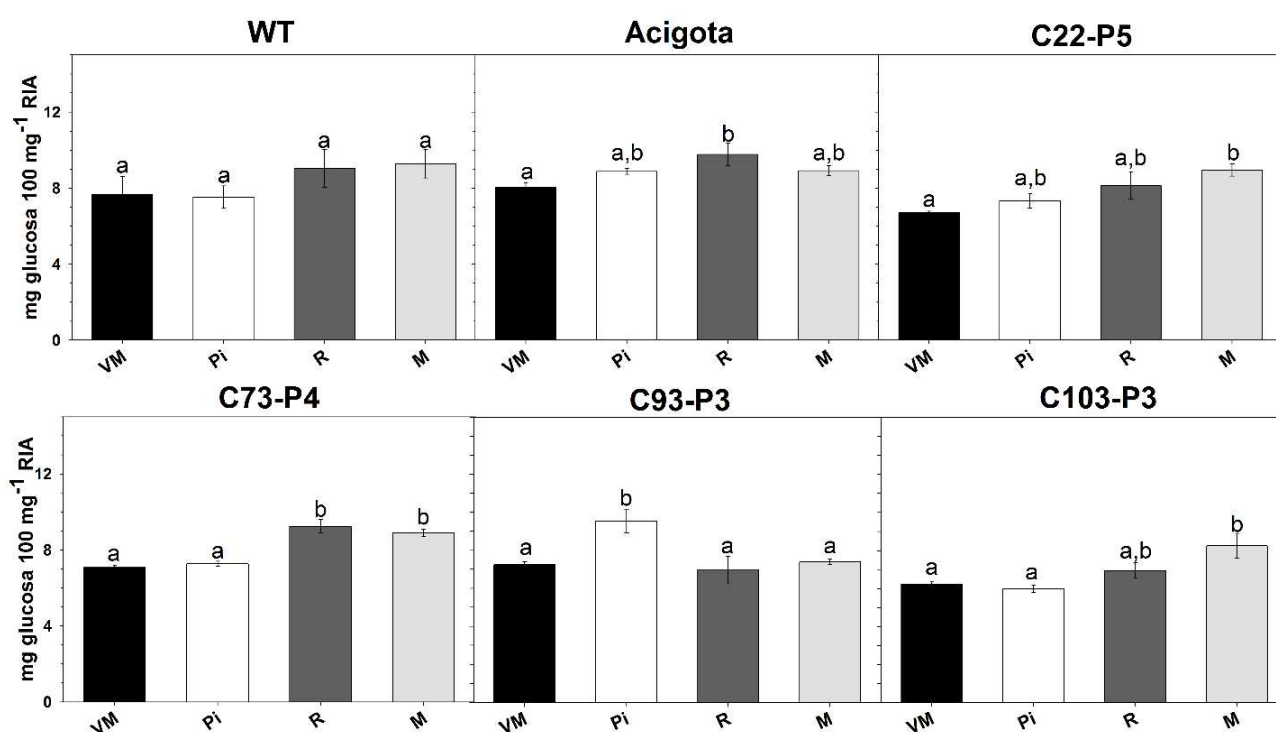
Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los datos fueron obtenidos como la suma de cada una de las fracciones de pectinas de cada replica biológica. Los resultados se expresan como mg de AG (ácido galacturónico) cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de pectinas totales (mg AG 100 mgr<sup>-1</sup> RIA)  $\pm$  SE de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

#### ✓ Hemicelulosas

Concluida la extracción fraccionada de las pectinas, se procedió a la extracción y cuantificación de las hemicelulosas. Este tipo de extracción se puede realizar también de manera fraccionada utilizando dos soluciones con álcali diluido y concentrado, lo

cual permite extraer las hemicelulosas débil y fuertemente unidas, respectivamente. En nuestro caso, se realizó con una única solución alcalina concentrada (NaOH 4 M) por lo cual se obtuvo una única fracción enriquecida en hemicelulosas débil y fuertemente unidas.

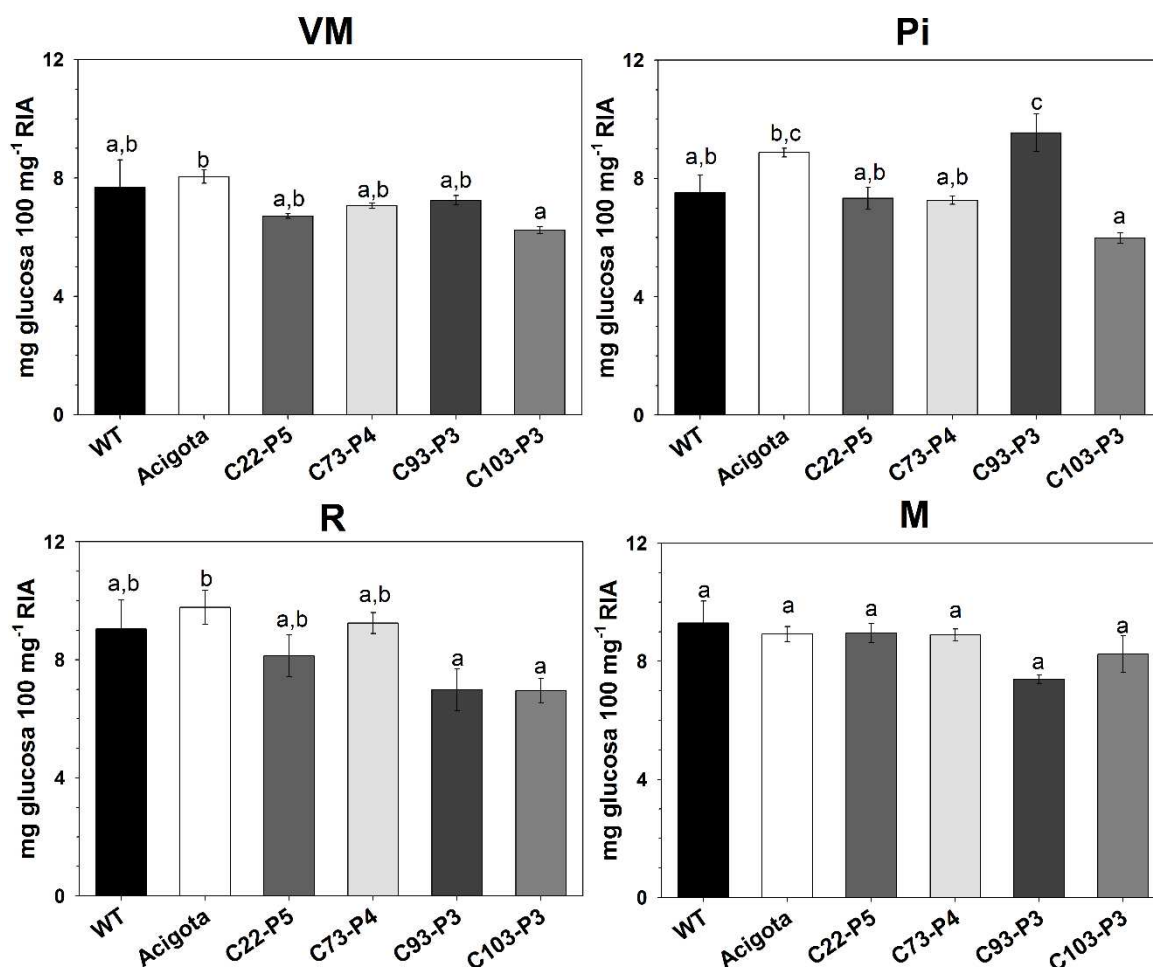
El contenido de hemicelulosas para cada planta en los diferentes estadios de madurez se muestra en la Figura 5.22. En la misma se observa que dicho contenido es aproximadamente constante en todos los estadios de madurez. Se observó un aumento del contenido de hemicelulosas para las plantas C22-P5 y C103-P3 en el estadio de madurez M y para la planta C73-P4 a partir del estadio R.



**Figura 5.22. Variación del contenido de hemicelulosas en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de glucosa cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de hemicelulosas (mg glucosa 100 mg<sup>-1</sup> RIA)  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

Sí se analiza que ocurre en cada estadio de madurez entre los controles y los frutos transgénicos, se denota que no existieron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de hemicelulosas, excepto en el caso del estadio Pintón donde los frutos de la planta C93-P3 presenta un contenido estadísticamente mayor de hemicelulosas que el WT (Figura 5.23).



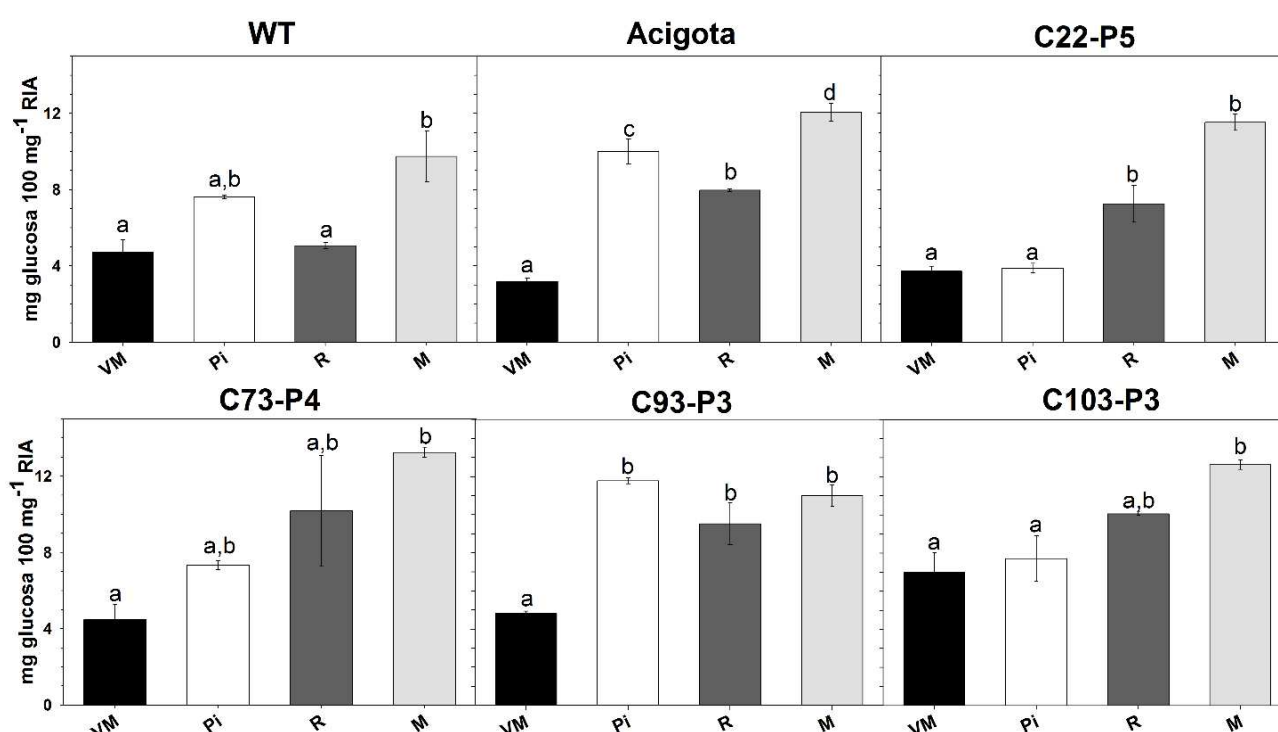
**Figura 5.23. Variación del contenido de hemicelulosas dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de glucosa cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de hemicelulosas (mg glucosa 100 mgr<sup>-1</sup> RIA) ± ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez.

## ✓ Celulosa

La última fracción analizada fue el contenido de celulosa, para lo cual se utilizó el residuo remanente luego de la extracción secuencial de pectinas y hemicelulosas. Dicho residuo fue sometido a una hidrólisis total con  $H_2SO_{4(c)}$ , y luego se cuantificó la cantidad de glucosa liberada.

El contenido de celulosa durante la maduración, como se observa en la Figura 5.24, aumenta a medida que los frutos maduran.

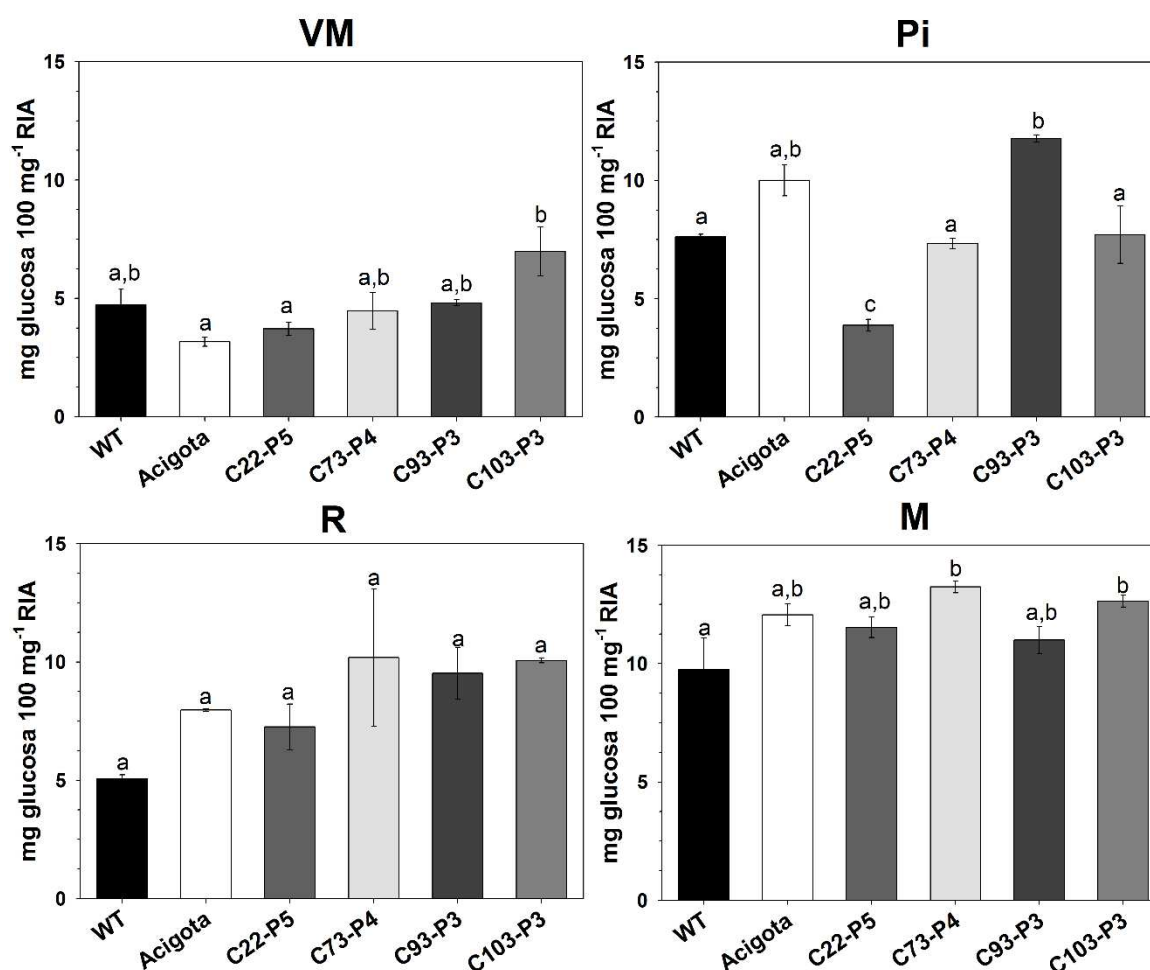


**Figura 5.24. Variación del contenido de celulosas en frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de glucosa cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de celulosas ( $\text{mg glucosa } 100 \text{ mgr}^{-1} \text{ RIA}$ )  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta.

Para no mal interpretar el resultado, es importante mencionar que el contenido de celulosa se expresa como mg de glucosa cada 100 g de RIA. Es decir, lo que se

observa es un aumento relativo del contenido de celulosa en el RIA, pero no estrictamente por peso de fruto ya que el contenido de RIA disminuye a medida que los frutos maduran (véase, Figura 5.12). Dado que nuestra intención era comparar la composición relativa de los principales componentes de la pared celular de frutos transgénicos con la de frutos controles, se eligió expresar los resultados de los fraccionamientos por masa de RIA.



**Figura 5.25. Variación de contenido de celulosas dentro de un mismo estadio de madurez entre frutos de plantas WT, acigota y sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: verde maduro (VM); pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como mg de glucosa cada 100 mg de RIA. Los datos corresponden al contenido medio de celulosas (mg glucosa 100 mgr<sup>-1</sup> RIA)  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron



analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas para un mismo estadio de madurez.

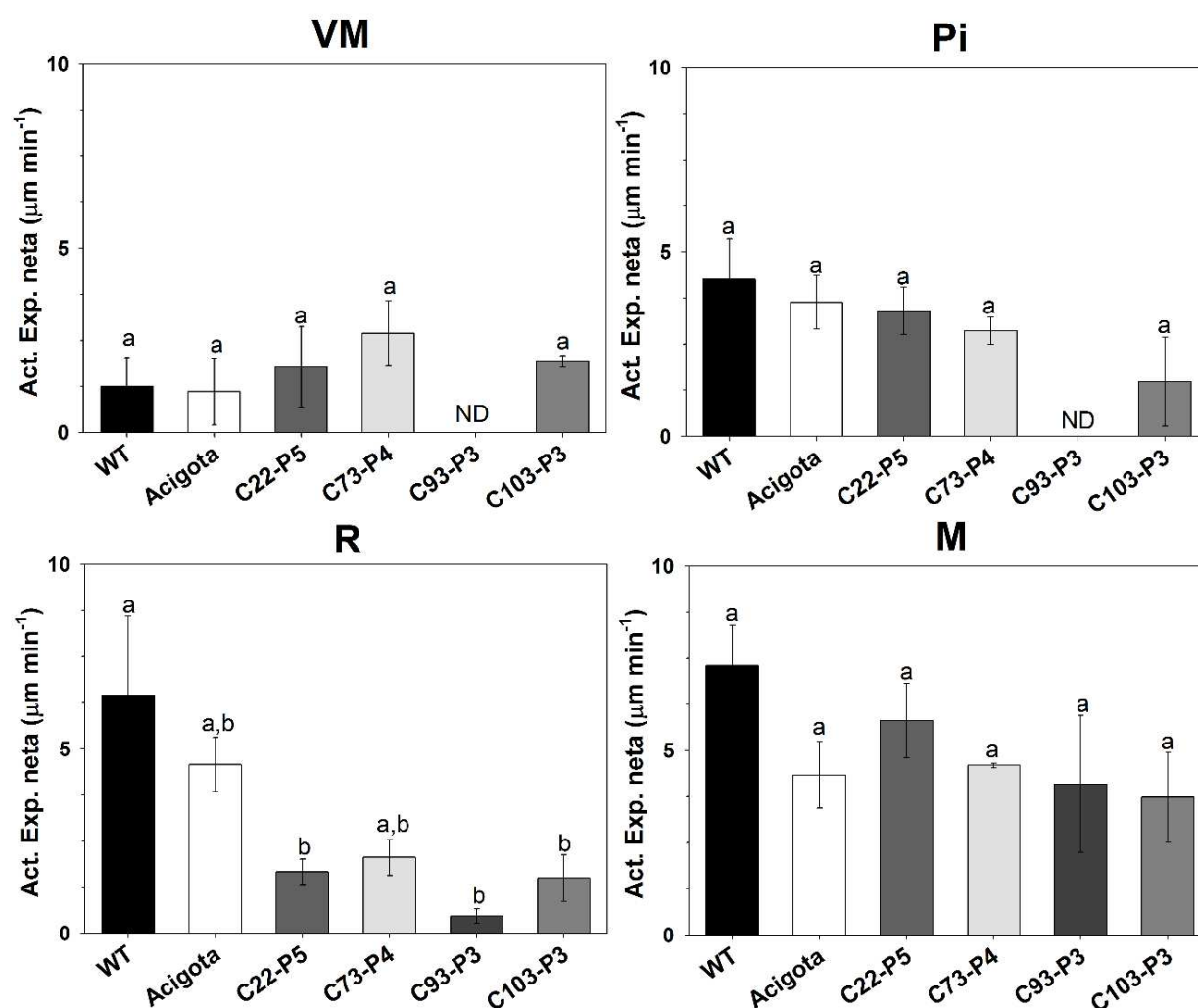
Ahora bien, si se analiza puntualmente el contenido de celulosa en cada estadio de madurez, podemos observar que no existe diferencias estadísticas en el contenido de celulosa entre los frutos controles (WT, acigota) y los frutos transgénicos analizados, a excepción del contenido de celulosa de los frutos C22-P5 en el estadio Pintón que presentaron un menor contenido (Figura 5.25).

### **5.3.7. Determinación del efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 sobre la actividad expansina**

Haciendo uso de la herramienta desarrollada y adaptada en el transcurso de esta tesis, con la puesta a punto de una medida confiable y repetitiva para cuantificar la actividad expansina, se procedió a determinar dicha actividad sobre los frutos de las plantas transgénicas generadas. Para ello, y siguiendo el mismo esquema de las determinaciones anteriores, se cosecharon frutos en cuatro estadios de madurez fisiológica (VM, Pi, R y M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y de cuatro plantas transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3).

Para el caso del estadio de madurez Verde Maduro, se observa una actividad expansina baja tanto para los frutos controles como para los transgénicos, no detectándose actividad expansina en los frutos de la planta C93-P3 (Figura 5.26). En el estadio de madurez pintón nuevamente para la planta C93-P3 no se observó actividad expansina, mientras que para las demás plantas transgénicas se observó una actividad inferior respecto a los controles (WT, acigota) aunque esta tendencia no resulta ser estadística. Para el estadio de madurez Rojizo, se observa que los frutos de las plantas

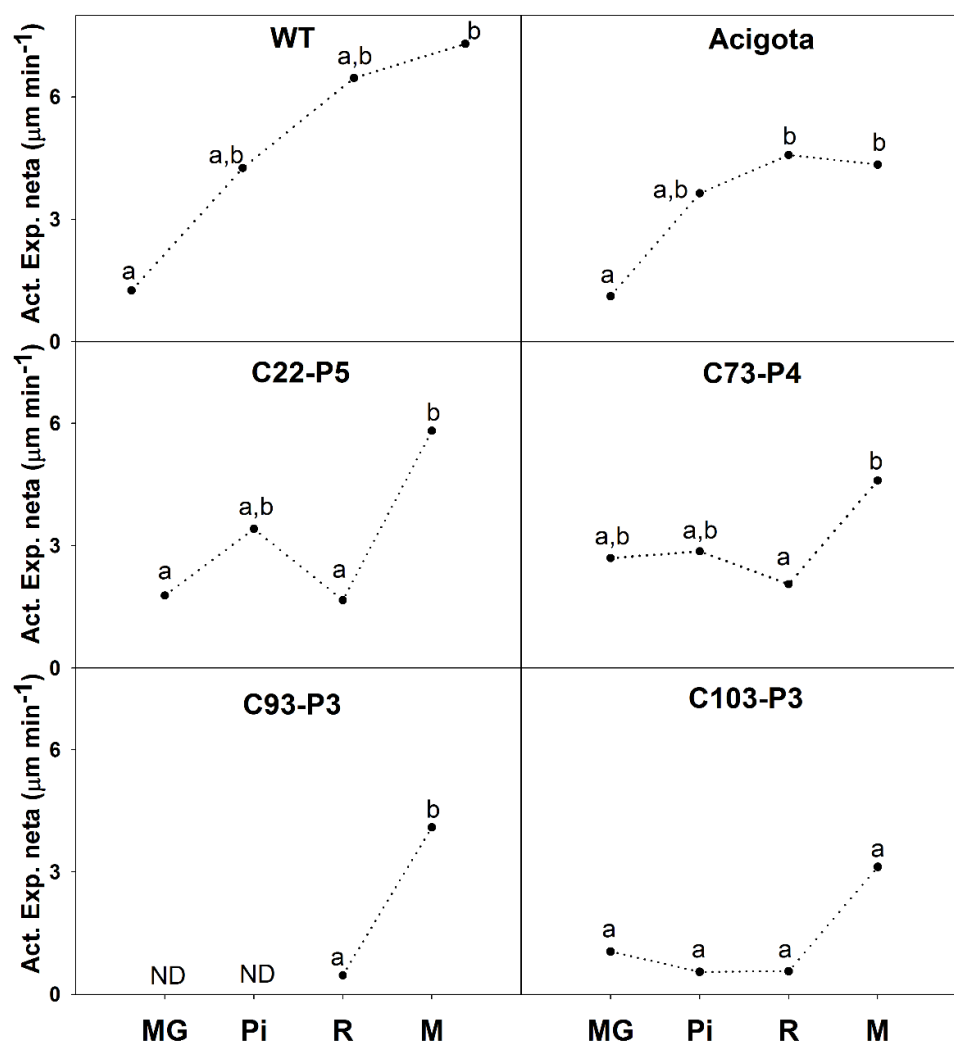
controles, presenta una marcada mayor actividad expansina en relación a los frutos transgénicos. Sin embargo, sólo los frutos de las plantas C22-P5, C93-P3 y C103-P3 presentan diferencias estadísticas frente al WT, aunque no así con los frutos acigotas (Figura 5.26). Por último, el análisis del estadio de madurez maduro nos arroja que no existen diferencias en la actividad expansina determinada para los diferentes frutos ensayados.



**Figura 5.26. Determinación de la actividad expansina.**

Se analizaron frutos en 4 estadios de madurez: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M) de plantas WT, acigota (C22-P4) y transgénicas (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los resultados se expresan como actividad expansina neta ( $\mu\text{m min}^{-1}$ ). Los datos corresponden a la actividad expansina neta (expresada como  $\mu\text{g min}^{-1}$ )  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de un mismo estadio de madurez. ND: no detectable.

Ahora bien, si se analizan los perfiles de estas actividades expansina durante la maduración, tal como se muestra en la Figura 5.27, se puede observar que dichos perfiles son diferentes en los frutos controles y en los transgénicos. Para el caso de los frutos controles, se observa que la actividad expansina aumenta gradualmente con el aumento de la madurez fisiológica de los frutos, llegando a un máximo a partir del estadio Rojizo. En cambio, para el caso de los frutos transgénicos se observa un nivel de actividad expansina basal hasta el estadio Rojizo, y recién en el estadio Maduro se observa un marcado aumento de dicha actividad.



**Figura 5.27. Perfil de actividad expansina en diferentes estadios de madurez fisiológica.**

Se muestran los valores medios de actividad expansina neta de los frutos en los 4 estadios de madurez de cada una de las plantas ensayadas: Verde Maduro (VM); Pintón (Pi); Rojizo (R); y Maduro (M). Plantas

control: WT, acigota (C22-P4) y plantas transgénicas: (C22-P5, C73-P4, C93-P3 y C103-P3). Los datos corresponden a la actividad expansina neta (expresada como  $\mu\text{g min}^{-1}$ )  $\pm$  ES de tres determinaciones independientes. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,10$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas dentro de una misma planta. ND: no detectable.

### **5.3.8. Análisis del efecto de la sobreexpresión de CBM-SIEXPA1 en el almacenamiento bajo condiciones controladas (ensayo de poscosecha)**

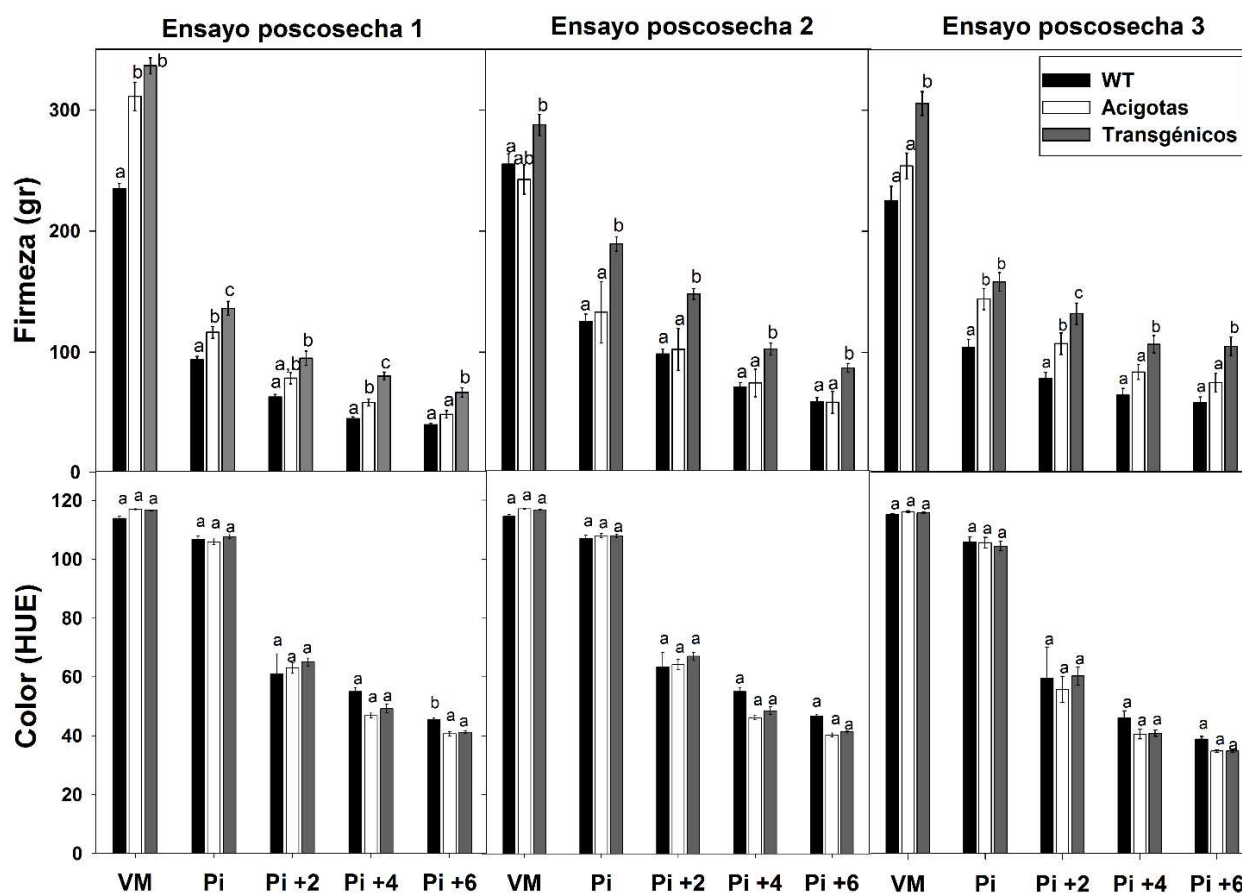
Para determinar cuál es el efecto de la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* durante el almacenamiento en condiciones controladas a través de un ensayo poscosecha, se decidió realizar un análisis clasificando a las plantas como acigotas o transgénicas (tal como se mencionó en la sección 5.4.2, véase Figura 5.5) para evidenciar el efecto de la sobreexpresión independientemente de la variabilidad propia de cada línea generada. Para ello, se realizaron tres ensayos poscosecha independientes donde se cosecharon entre 5 y 8 frutos en estadio Verde Maduro de cada una de las plantas generadas.

Una vez cosechados los frutos, se midió su firmeza y color superficial, se almacenaron a 22 °C en oscuridad, y se hicieron controles visuales diariamente. Una vez detectado que el fruto había virado a un estadio Pintón (Pi), se volvió a medir la firmeza y color superficial, y se repitieron estas medidas cada 2 d por un lapso de 6 d. La firmeza fue estimada como la fuerza necesaria para comprimir al fruto en 0,5 mm en la zona ecuatorial del mismo, ensayo considerado no destructivo (Brummell y col., 1999b), mientras que el color superficial se evaluó determinando el ángulo de matiz (HUE°). Este parámetro varía entre 0° y 360°, correspondiendo los ángulos 0°, 90° y 180° a los colores rojo, amarillo y verde, respectivamente. Los tres ensayos

independientes se llevaron a cabo en las mismas condiciones durante tres meses diferentes (junio, agosto y octubre).

El cambio de color observado durante el progreso de la maduración de los frutos se correlacionó con la disminución del ángulo HUE desde 110-100 a 30-40°, sin observarse diferencias significativas en la variación de color superficial entre frutos transgénicos, acigotas o WT (Figura 5.21).

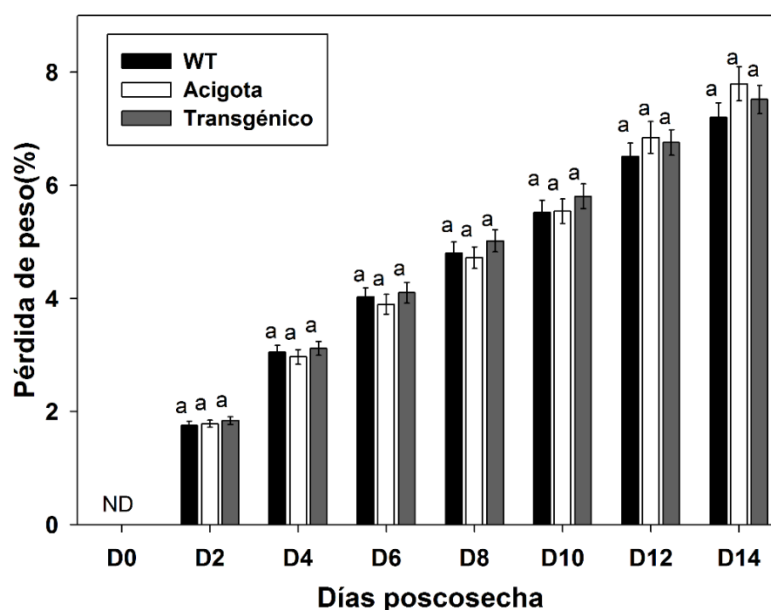
En cuanto a la medida de firmeza, se observó una reducción de la misma durante la maduración, indicando el progreso del ablandamiento de los frutos tanto para los controles como para los transgénicos (Figura 5.28). Sin embargo, la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* en la pared celular provocó un retraso significativo de la pérdida de firmeza del fruto durante el almacenamiento, en comparación con los frutos de las plantas acigotas o WT. Un análisis más detallado de los datos reveló que el valor medio de la firmeza de los frutos transgénicos fue siempre mayor que el correspondiente a los controles (WT y acigota), en todos los estadios, en los tres ensayos realizados. Esta diferencia fue estadísticamente significativa en todos los casos con respecto a los frutos WT; en cuanto a la comparación con los acigotas, esta diferencia fue significativa en la mayoría de los casos, con unas pocas excepciones.



**Figura 5.28. Efectos de la sobreexpresión del CBM-SI-EXP1 sobre la firmeza y color superficial de los frutos durante el almacenamiento post-cosecha.**

De seis a ocho frutos se cosecharon en VM de un total de 5 plantas WT, 7 plantas acigotas y 17 plantas transgénicas, y fueron almacenados a 22 °C en oscuridad. La firmeza del fruto y el color superficial se midieron a intervalos de 2 d después de que los frutos viraban a un estadio pintón (Pi) durante el almacenamiento. Los datos corresponden a la media de la firmeza o el color superficial  $\pm$  ES. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias estadísticas significativas entre los frutos WT, acigotas y transgénicos en la misma etapa de maduración.

Con el objetivo de identificar si existía alguna relación entre la pérdida de firmeza y la deshidratación durante el almacenamiento, se midió la pérdida de peso de los frutos durante 14 d (Figura 5.29). En la figura se observa que las pérdidas de peso aumentaron linealmente a tasas similares en todos los frutos analizados durante el almacenamiento, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre frutos WT, acigotas y transgénicos (Figura 5.22).



**Figura 5.29. Determinación de la Pérdida Peso (%) durante el almacenamiento bajo condiciones controladas.**

Se analizaron frutos de plantas WT, acigotas y transgénicas durante 14 días de almacenamiento después de ser cosechados. Los frutos se cosecharon en el estadio de madurez Verde Maduro, se registró su peso inicial y cada 2 días se registró su peso. Los frutos fueron almacenados a 22 °C en oscuridad. Los datos corresponden a la pérdida de peso media  $\pm$  ES de 6-8 frutos por planta independiente de 5 plantas WT, 7 plantas acigotas y 17 plantas transgénicas. Los resultados fueron analizados por ANOVA y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un  $p < 0,05$ . Las letras indican diferencias significativas entre los frutos WT, acigotas y transgénicos dentro del mismo día poscosecha.

## 5.5. DISCUSIÓN

La degradación y remodelación de las paredes celulares de las plantas implican la acción combinada de múltiples enzimas y proteínas no hidrolíticas que actúan sobre sustratos insolubles. Una característica común de muchas de estas enzimas es que incluyen un dominio catalítico y uno o más módulos CBM (Boraston y col., 2004). Se han propuesto tres funciones generales para los CBMs: (i) facilitar la proximidad del dominio catalítico al sustrato, (ii) dirigir el dominio catalítico al sustrato y (iii) provocar la ruptura del sustrato (Arantes y Saddler, 2010; Boraston y col., 2004).

Se han reportado múltiples efectos sobre fenotipos de plantas causados por la sobreexpresión de CBMs de diferentes fuentes (Boron y col., 2015). Se han realizado sobreexpresiones heterólogas de CBMs en diferentes plantas, tales como: un CBM bacteriano de *Clostridium cellulovorans* (CBPA) en *Solanum tuberosum* (papa) (Safradassa y col., 2006); un CBM putativo de expansina de papa en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) (Obembe y col., 2007); un CBM29-1-2 y un CBM2b-1-2 (construcciones de CBM en tándem), ambos bacterianos, en *N. tabacum* (Obembe y col., 2007b), un CBM de la expansina 2 de frutilla (*CBM-FaEXPA2*) en *A. thaliana* (Nardi y col., 2015), entre otros.

Sin embargo, de acuerdo a nuestro conocimiento, no existen estudios sobre la sobreexpresión de un CBM endógeno en frutos y su posible influencia sobre el ablandamiento del mismo. La elección del CBM de la expansina 1 de tomate en particular se basó en la relevancia del gen *SIEXPA1* (anteriormente denominado *LeEXP1*) en el ablandamiento de este fruto (Brummell y col., 1999; Brummell y Harpster, 2001; Rose y col., 1997), y por las propiedades de unión de estas proteínas a



los polisacáridos de la pared celular. La principal diana de los CBMs de expansinas de diferentes plantas y fuentes bacterianas parece ser la celulosa, aunque también serían capaces de unirse a xilanos y pectinas, pero con una afinidad aparente más baja (Cosgrove, 2000; Kerff y col., 2008; Nardi y col., 2013). Los resultados de los experimentos “*in vitro*” obtenidos para el CBM-SIEXPA1, detallados en el Capítulo II de la presente tesis, fueron en general coincidentes con estos datos mencionados de la bibliografía.

Con el fin de evaluar en detalle todos los efectos secundarios de la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* en el crecimiento y desarrollo de la planta, se midieron algunos de los parámetros comúnmente utilizados para caracterizar el fenotipo de plantas de tomate, a dos tiempos diferentes (40 y 60 d posgerminación). Del análisis de la altura de las plantas, del número de flores por racimo floral, del número de racimos florales, del área foliar y contenido de clorofila de la 4<sup>ta</sup> y 5<sup>ta</sup> hoja compuesta, se desprende que la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* no genera diferencias sustanciales en el crecimiento y desarrollo de la planta en comparación a plantas controles (WT y acigota). Conclusiones similares fueron alcanzadas por Nardi y col. (2015), quienes generaron y caracterizaron plantas sobreexpresantes del CBM de la expansina 2 de frutilla (*CBM-FaEXPA2*) en *A. thaliana*. Su análisis fenotípico no reveló diferencias durante el desarrollo de rosetas (número de hojas y diámetro de la roseta), aunque sí hubo diferencias en la altura de las plantas, siendo las sobreexpresantes más altas que las WT. Asimismo, la sobreexpresión de un CBM bacteriano de *C. cellulovorans* (CBPA) en papa (*S. tuberosum*) generó plantas transgénicas con tallos más largos y mayor peso fresco que las plantas control, pero de igual área foliar (Safra-Dassa y col., 2006).

Por otra parte, Brummell y col. (2002), demostraron que plantas suprimidas en *SIEXPA1*, presentaron frutos de igual tamaño y la misma cantidad de frutos por planta.

La sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* modificó las propiedades mecánicas de las hojas, aumentando su resistencia a la extensión y la punción, lo cual podría indicar una pared celular más resistente. Aproximaciones experimentales similares, realizadas en otros sistemas, no arrojaron el mismo resultado. En un trabajo realizado sobre plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del CBM de expansina 2 de frutilla, Nardi y col. (2015) evaluaron la resistencia mecánica de hojas de la roseta midiendo dos parámetros: la fuerza necesaria para romper el tejido; y el desplazamiento hasta la rotura. La fuerza de rotura de las hojas de las plantas transgénicas y WT fue similar, pero el desplazamiento hasta la rotura fue mayor para las hojas de las plantas que sobreexpresan *CBM-FaEXPA2*. Este comportamiento fue asociado al mayor contenido de pectinas presente en las plantas transgénicas, lo cual generaría una pared más deformable.

Los cambios de la calidad organoléptica de un fruto a medida que progresa la maduración, pueden ser evaluados a través de la medida de una serie de parámetros fisicoquímicos. En tomate, algunos de esos parámetros son el pH, la acidez titulable, el contenido de sólidos solubles y el contenido de azúcares totales y ácidos, entre otros (Klee y Giovannoni, 2011). En particular, la cantidad de azúcares, ácidos y la proporción relativa entre ambos contribuyen significativamente al sabor y el gusto del fruto de tomate (Heyes y Lugasi, 2006). En este trabajo, se cosecharon frutos sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* en cuatro diferentes estadios de madurez fisiológicas (VM, Pi, R y M) con la finalidad de determinar dichos parámetros. Los perfiles de variación de los mismos fueron coincidentes con los que ya han sido descritos en tomate, tanto para

los frutos controles como para los transgénicos. Durante la maduración de tomate, el pH del fruto permanece alrededor de 4, la acidez titulable disminuye a medida que progresa la maduración, los sólidos solubles varían usualmente entre 4 y 6 °Brix y el contenido de azúcares totales aumenta levemente (Heyes y Lugasi, 2006). Los frutos sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1* presentaron un aumento de acidez titulable y una disminución de sólidos solubles hacia los últimos estadios de madurez (Pi-M) en comparación con los frutos control (WT y acigota) mientras que no se observaron cambios en pH ni en el contenido de azúcares totales. El hecho de observarse un retraso en la caída de acidez podría deberse a un retraso madurativo de los frutos en planta para un mismo estadio de madurez fisiológico, aunque el desarrollo de color no está afectado dado que se cosecharon frutos con similar color superficial. En la experiencia realizada posteriormente, cosechando frutos VM y siguiendo su maduración durante la poscosecha, el desarrollo de color en los frutos transgénicos tampoco difirió de los controles, y sin embargo eran más firmes. Esto indica que ambos procesos, desarrollo de color y ablandamiento, podrían ser afectados de modo diferente por la exposición del fruto a una situación anormal, como es la sobreexpresión de una proteína en la pared celular.

La arquitectura de la pared celular y los polímeros que la componen, se modifican progresivamente durante la maduración, variando la naturaleza o extensión de los mismos (solubilización y depolimerización). La estructura de la pared celular se hace cada vez más soluble producto del cambio en la cohesión del gel de pectinas, siendo este uno de los principales factores que influyen en la facilidad con que las células pueden ser divididas o separadas entre sí, lo que contribuye a la textura del fruto (Jarvis, 1984). Una manera de poder cuantificar y caracterizar los cambios que

sufre la pared celular, es a través de la cuantificación de los residuos insolubles en alcohol (RIA) y su posterior fraccionamiento. Es importante mencionar que se trata de categorías arbitrarias de polisacáridos basadas en la solubilización de los mismos en un determinado solvente. Aunque las fracciones extraídas están enriquecidas en un particular tipo de polímero, no se puede descartar en ellas la presencia de polisacáridos correspondientes a las otras fracciones, y la composición precisa dependerá de las condiciones de extracción (Brummell y Harspter, 2001).

El análisis del contenido de pared celular total, evaluado a través de los niveles de residuos insolubles en alcohol (RIA), se realizó en 4 estadios de madurez (VM, Pi, R y M). En todos los casos, se observó una disminución del contenido de RIA durante la maduración, tanto para los frutos controles como para los transgénicos ensayados, aunque con perfiles diferentes (Figura 5.12). Del análisis del contenido de RIA por estadio de madurez, se observa claramente que, hacía los estadios de madurez más avanzados (R, M) el contenido de pared celular de los frutos transgénicos es mayor que en los controles (WT y acigota). Resultados similares se obtuvieron del análisis del contenido de pared celular de hojas y tallos de plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, siendo el contenido de RIA de las plantas sobreexpresantes mayor respecto a plantas WT (Nardi y col., 2015). Esto indica que la sobreexpresión de CBMs podría provocar un retardo en la degradación de los componentes de la pared celular. A fines de determinar el efecto sobre la cantidad de los principales tipos de polímeros que constituyen la pared celular, se continuó con un fraccionamiento secuencial del RIA con distintos solventes. De este modo, se obtuvieron fracciones enriquecidas en pectinas solubles en agua, pectinas solubles en EDTA, pectinas solubles en HCl, hemicelulosas totales, y celulosa.

En la mayoría de los frutos carnosos, incluido el tomate, se observa una mayor solubilización de las pectinas a medida que progresa el proceso de maduración. Estos cambios son reflejados por un aumento del contenido de pectinas en las fracciones de PSA y PSE, y un descenso de las mismas en la fracción de PSH, correspondiente a las pectinas fuertemente unidas a través de uniones covalentes (Brummell y Labavitch, 1997). En nuestro estudio, los perfiles de pectinas variaron durante la maduración de modo similar a lo descrito anteriormente. En líneas generales, tanto los frutos controles (WT y acigota) como los frutos transgénicos, presentaron una acumulación de las fracciones enriquecidas en PSA y PSE, mientras que en algunos casos las PSH (pectinas fuertemente unidas) disminuyeron. Asimismo, se observó que durante la maduración el contenido de pectinas totales, estimado como la suma de las medias de las fracciones de pectinas obtenidas, disminuyó (excepto en C73-P4, C103-P3). En línea con estos resultados, frutos sobreexpresantes del gen completo de *SIEXPA1* y frutos suprimidos para dicho gen, no presentaron cambios en el contenido de pectinas (pectinas solubles en EDTA y pectinas fuertemente unidas) durante la maduración respecto a frutos controles (Brummell y col, 1999b).

Del análisis del contenido de la fracción enriquecida en hemicelulosas totales se puede concluir que el mismo prácticamente no varía durante la maduración. A su vez, no se observaron diferencias entre los frutos transgénicos y acigotas. El contenido de xiloglucanos, las principales hemicelulosas en plantas dicotiledóneas, en el pericarpio y lóculo de frutos prácticamente no varía a lo largo de la maduración (Maclachlan y Brady, 1984). Sin embargo, sí se incrementa el grado de despolimerización del xiloglucano y de las demás hemicelulosas presentes en la pared celular, y este cambio es uno de los actores más importantes en el proceso de ablandamiento de frutos

carnosos (Brummell y col., 1999b; Tong y Gross, 1988). Si bien en nuestro caso no se analizó el nivel de depolimerización de dicha fracción, estudios previos mostraron que la sobreexpresión de *SIEXPA1* en frutos de tomate aumenta la depolimerización de las hemicelulosas marcadamente, mientras que la supresión de dicho gen no afecta de manera significativa el comportamiento respecto a los frutos de las plantas controles (Brummell y col., 1999b). Respecto al contenido de celulosa, estudios previos muestran que en tomate no existe evidencia de solubilización durante la maduración (Maclachlan y Brady, 1984). En nuestro caso la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* genera un leve incremento la proporción de celulosa en el RIA a lo largo de la maduración en todos los casos (frutos controles y transgénicos). Es importante mencionar que esto no estaría dado por un incremento de la síntesis de celulosa durante la maduración. Dado que el contenido de celulosa está expresado por masa de RIA, es probable que este aumento relativo de la celulosa se deba a que el contenido de pectinas decae durante la maduración, por lo cual cambia la composición relativa de la pared celular y se incrementa levemente el porcentaje de un componente esencialmente estable como es la celulosa.

Los cambios que ocurren en la pared celular de los frutos durante la maduración están estrechamente ligados con la acción de diversas enzimas involucradas en el metabolismo de la pared celular. Se sabe que las expansinas juegan un rol muy importante en este dismantelamiento de la pared celular. Es por ello que, haciendo uso de la adaptación metodológica comentada en el *capítulo 1* de la presente tesis, se ensayó la actividad expansina de las plantas transgénicas en cuatro estadios de madurez distintos. Se observó que la actividad expansina aumenta a medida que la madurez del fruto avanza. Un perfil similar de variación de la actividad expansina en

frutos de tomate WT (*S. Lycopersicum* cv. T5) fue obtenido por Rose y col. (2000), aunque la caracterización fue descriptiva y no se realizaron análisis estadísticos. En nuestro estudio, se observó que el aumento de actividad expansina es más marcado en los frutos controles entre los estadios Pi a M. En cambio, en el caso de los frutos transgénicos este incremento se produce en estadios más avanzados de maduración, en el pasaje de R a M, lo cual sugiere que la sobreexpresión de este CBM en la pared celular interfiere con la actividad de las expansinas presentes, y retrasa su aumento durante la maduración. Además de un efecto sobre la actividad expansina, la presencia del CBM sobreexpresado podría estar interfiriendo con otros aspectos de la degradación de la pared celular. En un estudio realizado en *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, se encontró que la actividad de cuatro enzimas relacionadas con el metabolismo de la pared celular (poligalacturonasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -arabinofuranosidasa) era menor en relación a los controles (Nardi y col., 2015). Esto sugiere que la sobreexpresión de CBMs en la pared celular interfiere no solo con la actividad de las expansinas propias, sino que también afecta la actividad de otras enzimas relacionadas al metabolismo de la pared celular. En su conjunto, todo esto provocaría el retraso de la degradación de la pared celular previamente comentado.

*Botrytis cinerea* es uno de los hongos patógenos de tipo necrotrófico más estudiado, responsable de la enfermedad del moho gris y un contribuyente significativo a la descomposición poscosecha de los frutos carnosos frescos (Shah y col., 2012; Van Kan, 2006). En este trabajo, se seleccionaron frutos controles (WT y acigota) y transgénicos para analizar si la sobreexpresión del *CBM-SIEXPA1* de alguna manera afecta la susceptibilidad de los frutos de tomate a infecciones por *B. cinerea*. La

infección de frutos frescos con conidios del hongo indicó que los frutos sobreexpresantes son menos susceptibles al crecimiento del patógeno. Asimismo, el cultivo "*in vitro*" de *B. cinerea* sobre medios conteniendo la misma cantidad de RIA de plantas controles y transgénicas, como única fuente de carbono, indicó que el hongo crecía menos con RIAs de plantas transgénicas como sustrato. Cabe aclarar que estos RIAs contenían principalmente material de pared celular, acompañado por una pequeña cantidad de almidón, que resultó ser similar en todas las muestras (Perini y col., 2017). De este modo, el menor crecimiento del hongo sobre RIAs provenientes de frutos transgénicos puede atribuirse a la presencia de una pared celular más íntegra, y no a una cantidad diferencial de almidón. Un resultado similar fue descrito en hojas de *A. thaliana* sobreexpresantes del *CBM-FaEXPA2*, las cuales eran menos susceptibles al crecimiento de dicho hongo en relación a hojas WT. Un resultado contradictorio fue descrito en el caso de frutos de tomate que tenían suprimido el gen de *SIEXPA1*. De algún modo, nuestras plantas, sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*, se asemejan a plantas donde la expresión del gen completo (*SIEXPA1*) fue suprimida. Ambas plantas presentan un mayor contenido de pared celular y menor actividad expansina. Sin embargo, Brummell y col., (2002) determinaron la presencia de lesiones más grandes de la enfermedad en frutos que poseían a *SIEXPA1* suprimida cuando fueron expuestos a *B. cinerea* y a *A. alternata*. De otro modo, frutos de tomate con supresión simultánea de *SIEXPA1* y *SIPG*, el gen de la poligalacturonasa asociada a la maduración, fueron menos susceptibles a la infección por *B. cinerea* que los controles (Cantu y col., 2008). La supresión de la expresión de ambos genes condujo a una reducción dramática en la depolimerización de las fracciones de pectina, mientras que no se observaron alteraciones de la composición de la hemicelulosa, solubilidad o distribución de tamaño



(Cantu y col., 2008). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión del CBM (*CBM-SIEXPA1*) podría influir en el curso de una infección por parte de un patógeno como *B. cinerea*, posiblemente a través de la modificación de la estructura de la pared celular y/o la accesibilidad de los polisacáridos de la pared celular del fruto a las enzimas de *B. cinerea* encargadas de degradar dichos polisacáridos (Blanco-Ulate y col., 2013).

Por último, con el fin de evaluar el efecto de la sobreexpresión de *CBM-SIEXPA1* en el almacenamiento de los frutos bajo condiciones controladas, se realizó un ensayo poscosecha. La maduración de los frutos fue seguida midiendo el cambio del color superficial, la firmeza del fruto y la pérdida de peso. Tanto el color superficial como la pérdida de peso, presentaron perfiles de variación similares y no se observaron diferencias entre frutos controles y transgénicos. Los porcentajes de pérdida de peso estuvieron entre 7% y 8% del peso inicial, coincidentes con los observados en otros frutos almacenados en condiciones similares (Javanmardi y Kubota, 2006). Respecto a la firmeza, todos los frutos se ablandaron durante el almacenamiento. Sin embargo, los frutos de las plantas transgénicas que sobreexpresan el *CBM-SIEXPA1* presentaron un retraso significativo de la pérdida de firmeza de la pulpa durante el almacenamiento en comparación con los frutos de las plantas acigotas o WT. El hecho de que no haya diferencias estadísticas en la pérdida de peso de los frutos durante el almacenamiento indica que la mayor firmeza observada en los frutos transgénicos no estaría directamente asociada con la pérdida de agua y turgencia del fruto.

En línea con estos resultados, Brummell y col., (1999b) describieron que plantas de tomate sobreexpresantes de *SIEXPA1* produjeron frutos más pequeños y blandos que los frutos de las plantas control, mientras que, planta de tomate suprimidas

en *SIEXPA1* produjeron frutos más firmes que los controles. Asimismo, se reportó que plantas que sobreexpresan *SIEXPA1* bajo un promotor fruto específico (ACC sintasa 4 (LeACS4Pro)) generaron frutos más blandos (Kaur y col., 2010). Más recientemente, se describió la obtención de plantas de tomate mutantes por tratamientos con metanosulfonato de etilo (EMS). Por esta metodología se generaron 9980 plantas, de las cuales se seleccionaron aquellas que poseían mutagenizado el gen de *SIEXPA1*, utilizando la estrategia de TILLING (*del inglés*, Targeting Induced Local Lesions in Genomes). El análisis fenotípico de las plantas mutantes permitió identificar dos variantes (Slexp1-6, (W211S) y Slexp1-7, (Q213Stop)) que mejoran la vida útil del fruto y retardan el ablandamiento del mismo (Minoia y col., 2015). Llamativamente, ambas mutaciones que afectan el ablandamiento del fruto son mutaciones puntuales en la zona correspondiente a la secuencia del CBM de *SIEXPA1*. También se analizaron plantas con mutaciones puntuales sobre la zona del dominio catalítico putativo de expansina, y se determinó que las mismas producían frutos que se ablandaban igual que los controles (Minoia y col., 2015).

La supresión de *SIEXPA1* (Brummell y col., 1999b), la mutación de *SIEXPA1* en la secuencia de codificación de CBM por TILLING (Minoia y col., 2015) y la sobreexpresión de *CBM-SIEXPA1*, descrita en esta tesis, son estrategias diferentes dirigidas a reducir o suprimir la actividad expansina en el fruto, y todas ellas retrasaron exitosamente el ablandamiento del fruto. El efecto de estas estrategias en el ablandamiento del fruto podría estar relacionado con la interferencia causada en la actividad normal de la expansina. La primera porque la expresión de *SIEXPA1* fue suprimida; la segunda porque se produjo una *SIEXPA1* mutante, probablemente no

funcional; y la tercera porque condujo a la acumulación de *CBM-SIEXPA1* en la pared celular, que podría interferir con la unión de la expansina a su/s sustrato/s.

Los resultados obtenidos con estas dos últimas estrategias que involucran el CBM de *SIEXPA1* y los resultados obtenidos en *A. thaliana* con el CBM de *FaEXPA2*, mencionados anteriormente, sugieren que la contribución de los CBMs en el metabolismo de la pared celular podría ser de gran relevancia. Asimismo, su sobreexpresión en la pared celular sería otra herramienta biotecnológica a tener en cuenta a fines de controlar el ablandamiento de un fruto y reducir su susceptibilidad a patógenos.

## ***6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS***

## 6.1. CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis, se estudió y caracterizó a través de distintas aproximaciones experimentales la proteína expansina 1 de tomate (*Solanum Lycopersicum*, SIEXPA1); proteína íntimamente involucrada en el metabolismo de la pared celular vegetal durante la maduración del fruto.

Se logró acondicionar un método para poder medir la actividad enzimática no hidrolítica de esta proteína, la cual hasta la actualidad estaba limitada a ser ensayada en unos pocos laboratorios alrededor del mundo. Asimismo, se logró usar diferentes matrices celulares con diferentes extractos proteicos, otorgándonos la capacidad de tener una mayor versatilidad a la hora de plantear el análisis de diferentes tejidos vegetales. Esto representa una herramienta de extrema importancia, no sólo para poder caracterizar el perfil de actividad expansina de frutos de tomate, que fue nuestro objetivo, sino que también otorga una nueva herramienta complementaria para futuros trabajos de investigación relacionados directa o indirectamente con el metabolismo de la pared celular y potenciales contribuciones relacionadas con los mecanismos de acción de dichas proteínas.

La estructura de la expansina 1 de tomate presenta una organización modular característica de  $\alpha$ -expansinas, y de algunas otras proteínas del metabolismo de la pared celular vegetal, que consta de un péptido señal, un dominio de unión a carbohidratos y un dominio catalítico putativo. Con la finalidad de contribuir al conocimiento acerca del mecanismo de interacción (unión) tanto de la proteína completa como de sus dominios característicos, dichas proteínas fueron sobreexpresadas en un sistema de expresión heterólogo (*E. coli*). De dicho análisis se desprende que tanto la proteína completa como ambos dominios se unen a celulosa

microcristalina y xilano de avena. En el caso de la celulosa, la mayor afinidad correspondió al CBM y la proteína completa, mientras que para el xilano la mayor afinidad se observó para la proteína completa y el dominio catalítico putativo. Estos datos experimentales de la unión de los distintos dominios con la celulosa y hemicelulosa coinciden con la propuesta vigente de que las  $\alpha$ -expansinas se unirían a través del dominio CBM a celulosa mientras que el dominio catalítico putativo intervendría en la relajación de la matriz de hemicelulosas (xiloglucano) con la consecuente relajación de dicha pared celular vegetal.

Por último, se generaron y caracterizaron plantas de tomate sobreexpresantes del CBM de la expansina 1 de tomate (*CBM-SIEXPA1*) bajo un promotor constitutivo. Dicha sobreexpresión generó un aumento en el contenido de pared celular, que correlacionó con un retraso en el proceso de ablandamiento del fruto y una reducción en la susceptibilidad al ataque por *Botrytis cinerea*. Sin embargo, la sobreexpresión del CBM no afectó de manera significativa el desarrollo de la planta. De este modo, la sobreexpresión de un CBM de expansina en la pared celular sería una estrategia factible de utilizar para retrasar el ablandamiento y aumentar la vida poscosecha del tomate, y posiblemente de otros frutos carnosos. Además, sería una herramienta promisorio para el desarrollo de cultivares resistentes a *B. cinerea* u otros patógenos con mecanismos de infección similares.

## 6.2. PERSPECTIVAS

- Utilizar la medida de la actividad expansina en la caracterización de cultivares de firmeza contrastante, efectos de tratamientos poscosecha sobre el ablandamiento de frutos, etc., que hasta ahora no era posible de realizar en la mayoría de los laboratorios;
- Analizar el grado de depolimerización de los componentes de la pared celular de las plantas sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*, en comparación a los controles;
- Analizar el grado de cristalinidad de la celulosa presente en la pared de plantas sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*;
- Caracterizar con técnicas de microscopia de avanzada la matriz de celulosa-hemicelulosa sobre plantas sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*;
- Analizar los niveles de expresión a nivel de ARNm, de genes involucrados en el metabolismo de la pared celular, incluidos aquellos de la ruta de síntesis de celulosa, en frutos de las plantas de tomate sobreexpresantes del *CBM-SIEXPA1*.

## ***7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



---

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, D.P.F., Huber, D.J. (1999). *Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening*. *Physiol. Plant.* **105**, 506–512.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- AOAC. (1998). *Official Methods of Analysis*, **16<sup>th</sup> ed.** AOAC International. Gaithersburg, USA.
- Arantes, V., Saddler, J.N. (2010). *Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis*. *Biotechnol. Biofuels* **3**, 1–11.
- Baron-Epel, O., Gharyal, P.K., Schindler, M. (1988). *Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells*. *Planta* **175**, 389–395.
- Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J.A., McQueen-Mason, S. (2005). *Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in Sambucus nigra*. *J. Exp. Bot.* **56**, 817–823.
- Bennett, A.B. (2012). *Taste: Unraveling tomato flavor*. *Curr. Biol.* **22**, 443–444.
- Berdichevsky, Y., Lamed, R., Frenkel, D., Gophna, U., Bayer, E.A., Yaron, S., Shoham, Y., Benhar, I. (1999). *Matrix-assisted refolding of single-chain Fv- cellulose binding domain fusion proteins*. *Protein Expr. Purif.* **17**, 249–259.
- Blanco-Ulate, B., Vincenti, E., Powell, A.L.T., Cantu, D., 2013. *Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and Botrytis cinerea*. *Front. Plant Sci.* **4**, 142.
- Blanco-Ulate, B., Vincenti E., Cantu, D. y Powell A.L.T. (2016). *Botrytis the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. Chapter 19. Ripening of Tomato Fruit and Susceptibility to Botrytis cinerea*. S. (Eds.: Fillinger, S., Elad, Y.). Springer. pp. 387-412.

- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987). *Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels*. Electrophoresis **8**, 93–99.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. (1973). *New method for quantitative determination of uronic acids*. Anal. Biochem. **54**, 484–489.
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J. (2004). *Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition*. Biochem. J. **382**, 769–781.
- Boron, A.K., Van Loock, B., Suslov, D., Markakis, M.N., Verbelen, J.P., Vissenberg, K. (2015). *Over-expression of AtEXLA2 alters etiolated arabidopsis hypocotyl growth*. Ann. Bot. **115**, 67–80.
- Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. **72**, 248–254.
- Brummell, D.A., Labavitch, J.M. (1997). *Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates*. Plant Physiol. **115**, 717–725.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H., Dunsmuir, A.P. (1999). *Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit*. Plant Mol. Biol. **39**, 161–169.
- Brummell, D.A., Harpster, M., Civello, P.M., Palys, J., Bennett, A., Dunsmuir, P. (1999b). *Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening*. Plant Cell **11**, 2203–2216.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. (2001). *Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants*. Plant Mol. Biol. **47**, 311–340.
- Brummell, D.A., Howie, W.J., Ma, C., Dunsmuir, P. (2002). *Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin*. Postharvest Biol. Technol. **25**, 209–220.
- Brummell, D.A., (2006). *Cell wall disassembly in ripening fruit*. Funct. Plant Biol. **33**, 103–119.

- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. (2008). *The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to Botrytis cinerea*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **105**, 859–864.
- Carpita, N.C., Kanabus, J. (1987). *Extraction of starch by dimethyl sulfoxide and quantitation by enzymatic assay*. Anal. Biochem. **161**, 132–139.
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M. (1993). *Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. Plant J. **3**, 1–30.
- Carpita NC, McCann MC (2000). *The cell wall*. In 'Biochemistry and molecular biology of plants'. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MD. (Eds.: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L.) pp. 52–108.
- Chen, L.J., Coutinho, P.M., Nikolov, Z., Ford, C. (1995). *Deletion analysis of the starch-binding domain of Aspergillus glucoamylase*. Protein Eng. **8**, 1049–1055.
- Cho, H.T., Cosgrove, D.J. (2000). *Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **97**, 9783–9788.
- Civello, P.M., Powell, A.L.T., Sabehat, A., Bennett, A.B. (1999). *An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry Fruit*. Plant Physiol. **121**, 1273–1279.
- Cleemput, G., Helsing, M., Van Oort, M., Deconynck, M., Delcour, J.A. (1997). *Purification and Characterization of a [beta]-D-Xylosidase and an Endo-Xylanase from Wheat Flour*. Plant Physiol. **113**, 377–386.
- Cleland, R.E., Cosgrove, D.J., Tepfer, M. (1987). *Long-term acid-induced wall extension in an in-vitro system*. Planta **170**, 379–385.
- Cosgrove, D.J. (1989). *Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls*. Planta **177**, 121–130.
- Cosgrove, D.J. (1997). *Creeping walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing roles of expansins*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 5504–5505.

- Cosgrove, D.J. (1998). *Update on Cell Growth Cell Wall Loosening by Expansins 1*. Plant Physiol. **118**, 333–339.
- Cosgrove, D.J. (1999). *Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **50**, 391–417.
- Cosgrove, D.J. (2000). *Loosening of plant cell walls by expansins*. Nature **407**, 321–326.
- Cosgrove D.J. (2011). In *The Plant Cell Wall: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Chapter 20: Measuring In Vitro Extensibility of Growing Plant Cell Walls*. Humana Press, c/o Springer Science Business Media, New York. (Ed.: Popper, Z. A.) pp. 291-303.
- Crookes, P.R., Grierson, D. (1983). *Ultrastructure of Tomato Fruit Ripening and the Role of Polygalacturonase Isoenzymes in Cell Wall Degradation*. Plant Physiol. **72**, 1088–1093.
- Coutinho, P. M. and Henrissat, B. (1999). In *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. (Eds.: Gilbert, H.J., G. Davies, G., Henrissat B., Svensson, B.). pp. 3–12.
- D'Amour, J., Gosselin, C., Arul, J., Castaigne, F., Willemot, C. (1993). *Gamma-radiation affects cell wall composition of strawberries*. J. Food Sci. **58**, 182–185.
- De Bernardez Clark, E. (1998). *Refolding of recombinant proteins TL-9*. Curr. Opin. Biotechnol. **9**, 157–163.
- Dhugga, K.S. (2001). *Building the wall: Genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases*. Curr. Opin. Plant Biol. **4**, 488–493.
- Diaz, J. V., Anthon, G.E., Barrett, D.M. (2007). *Nonenzymatic degradation of citrus pectin and pectate during prolonged heating: Effects of pH, temperature, and degree of methyl esterification*. J. Agric. Food Chem. **55**, 5131–5136.
- Dotto, M.C., Martínez, G.A., Civello, P.M. (2006). *Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness*. Plant Physiol. Biochem. **44**, 301–307.

- Eiberle, M.K., Jungbauer, A. (2010). *Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate?*. Biotechnol. J. **5**, 547–559.
- Emons, A.M.C. (1988). *Methods for visualizing cell wall texture*. Acta Bot. Neerl. **37**, 31–38.
- Fischer L, R., Bennett B, A. (1991). *Role of Cell Wall Hydrolases in Fruit Ripening*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**, 675–703.
- Fry, S.C. (1986). *Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms*. Annu. Rev. Plant Physiol. **37**, 165–186.
- Fry, S.C. (1989). *Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship*. Physiol. Plant. **75**, 532–536.
- Gautam, S., Dubey, P., Rather, G.M., Gupta, M.N. (2012). *Non-chromatographic strategies for protein refolding*. Recent Pat. Biotechnol. **6**, 57–68.
- Georgelis, N., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., Cosgrove, D.J. (2011). *Structure-function analysis of the bacterial expansin EXLX1*. J. Biol. Chem. **286**, 16814–16823.
- Georgelis, N., Yennawar, N.H., Cosgrove, D.J. (2012). *Structural basis for entropy-driven cellulose binding by a type-A cellulose-binding module (CBM) and bacterial expansin*. Proc. Natl. Acad. Sci. **109**, 14830–14835.
- Gilkes, N.R., Henrissat, B., Kilburn, D.G., Miller, R.C., Warren, R.A.J. (1991). *Domains in Microbial 3-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families*. Microbiol. Rev. **55**, 303–315.
- Giovannoni, J. (2004). *Genetic regulation of fruit development and ripening*. Plant Cell Online **16**, 170–181.
- Gookin, T.E., Hunter, D.A., Reid, M.S. (2003). *Temporal analysis of alpha and beta-expansin expression during floral opening and senescence*. Plant Sci. **164**, 769–781.
- Goulao, L.F., Santos, J., De Sousa, I., Oliveira, C.M. (2007). *Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples*. Postharvest Biol. Technol. **43**, 307–318.

- Gross, K.C. (1984). *Fractionation and partial characterization of cell walls from normal and non-ripening mutant tomato fruit*. *Physiol. Plant.* **62**, 25–32.
- Gross, K.C., Sams, C.E. (1984). *Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species review*. *Phytochemistry*. **23**, 2457–2461.
- Hadfield, K.A., Bennett, A.B. (1998). *Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function*. *Plant Physiol.* **117**, 337–343.
- Hamamoto, T., Foong, F., Shoseyov, O., Doi, R.H. (1992). *Analysis of functional domains of endoglucanases from Clostridium cellulovorans by gene cloning, nucleotide sequencing and chimeric protein construction*. *MGG Mol. Gen. Genet.* **231**, 472–479.
- Harker, F.R., Redgwell, R.J., Hallett, I.C., Murray, S.H., Carter, G. (1997). *Texture of fresh fruit*. *Hortic. Rev. Am. Soc. Hortic. Sci.* **20**, 121–224.
- Harrison, E.P., McQueen-Mason, S.J., Manning, K. (2001). *Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit*. *J. Exp. Bot.* **52**, 1437–1446.
- Hayama, H., Ito, A., Moriguchi, T., Kashimura, Y. (2003). *Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening*. *Postharvest Biol. Technol.* **29**, 1–10.
- Hayashi T. (1989). *Xyloglucans in the primary cell wall*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi.* **2**, 1–19.
- Helyes, L., Lugasi, A. (2006). *Formation of certain compounds having technological and nutritional importance in tomato fruits during maturation*. *Acta Aliment.* **35**, 183–193.
- Henrissat, B., Teeri, T.T., Warren, R.A.J. (1998). *A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants*. *FEBS Lett.* **425**, 352–354.
- Hiwasa, K., Rose, J.K.C., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. (2003). *Differential expression of seven alpha-expansin genes during growth and ripening of pear fruit*. *Physiol. Plant.* **117**, 564–572.

- Huber, D.J., O'Donoghue, E.M. (1993). *Polyuronides in Avocado (Persea americana) and Tomato (Lycopersicon esculentum) Fruits Exhibit Markedly Different Patterns of Molecular Weight Downshifts during Ripening*. Plant Physiol. **102**, 473–480.
- Idígoras, G. (2014). *Producción y Procesamiento de Productos Frutihortícolas; Agroindustrias; Argentina Innovadora 2020*. Plan Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva.
- Jarvis, M.C. (1984). *Structure and properties of pectin gels in plant-cell walls*. Plant Cell Environ. **7**, 153–164.
- Javanmardi, J., Kubota, C. (2006). *Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage*. Postharvest Biol. Technol. **41**, 151–155.
- John, I., Hackett, R., Cooper, W., Drake, R., Farrell, A., Grierson, D. (1997). *Cloning and characterization of tomato leaf senescence-related cDNAs*. Plant Mol. Biol. **33**, 641–651.
- Jungbauer, A., Kaar, W. (2007). *Current status of technical protein refolding*. J. Biotechnol. **128**, 587–596.
- Kader, A.A. (2005). *Increasing food availability by reducing postharvest losses of fresh produce*. Acta Horticulturae. **682**, 2169-2176.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). *GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation*. Trends Plant Sci. **7**, 193–195.
- Kaur, P., Samuel, D.V.K., Bansal, K.C. (2010). *Fruit-specific Over-expression of LeEXP1 Gene in Tomato Alters Fruit Texture*. J. Plant Biochem. Biotechnol. **19**, 177–183.
- Kende, H., Bradford, K.J., Brummell, D.A., Cho, H.T., Cosgrove, D.J., Fleming, A.J., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J.K.C., Voesenek, L.A.C.J. (2004). *Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins*. Plant Mol. Biol. **55**, 311–314.

- Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., Charlier, P., Joris, B., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., Cosgrove, D.J. (2008). *Crystal structure and activity of Bacillus subtilis YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **105**, 16876–16881.
- Klee, H.J., Giovannoni, J.J. (2011). *Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes*. Annu. Rev. Genet. **45**, 41–59.
- Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature **227**, 680–685.
- Lara, I., Belge, B., Goulao, L.F. (2014). *Postharvest Biology and Technology The fruit cuticle as a modulator of postharvest quality*. Postharvest Biol. Technol. **87**, 103–112.
- Lee, Y., Choi, D., Kende, H. (2001). *Expansins: Ever-expanding numbers and functions*. Curr. Opin. Plant Biol. **4**, 527–532.
- Levy, I., Shoseyov, O. (2002). *Cellulose-binding domains: Biotechnological applications*. Biotechnol. Adv. **20**, 191–213.
- Li, X., Xu, C., Korban, S., Chen, K. (2010). *Regulatory Mechanisms of Textural Changes in Ripening Fruits*. CRC. Crit. Rev. Plant Sci. **29**, 222–243.
- Li, Y., Jones, L., McQueen-Mason, S. (2003). *Expansins and cell growth*. Curr. Opin. Plant Biol. **6**, 603–610.
- Lu, Y., Liu, L., Wang, X., Han, Z., Ouyang, B., Zhang, J., Li, H. (2015). *Genome-wide identification and expression analysis of the expansin gene family in tomato*. Mol. Genet. Genomics **291**, 597–608.
- Maclachlan, G., Brady, C. (1994). *Endo-1,4-[beta]-Glucanase, Xyloglucanase, and Xyloglucan Endo-Transglycosylase Activities Versus Potential Substrates in Ripening Tomatoes*. Plant Physiol. **105**, 965–974.
- Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gouble, B., Gomez, R.M., Audergon, J.M., Albagnac, G., Fils-Lycaon, B. (2002). *Two expansin cDNAs from Prunus armeniaca expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene*. Plant Physiol. Biochem. **40**, 445–452.



- McCann, M.C., Wells, B., Roberts, K., (1990). *Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall*. J. Cell Sci. **96**, 323–334.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. (1992). *Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants*. Plant Cell **4**, 1425–1433.
- McQueen-Mason, S.J., Fry, S.C., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J. (1993). *The relationship between xyloglucan endotransglycosylase and in-vitro cell wall extension in cucumber hypocotyls*. Planta **190**, 327–331.
- McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J. (1994). *Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**, 6574–6578.
- McQueen-Mason, S.J., Cosgrove, D.J. (1995). *Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding*. Plant Physiol. **107**, 87–100.
- Middelberg, A.P.J. (2002). *Preparative protein refolding*. Trends Biotechnol. **20**, 437–443.
- Minoia, S., Boualem, A., Marcel, F., Troadec, C., Quemener, B., Cellini, F., Petrozza, A., Vigouroux, J., Lahaye, M., Carriero, F., Bendahmane, A. (2015). *Induced mutations in tomato SIExp1 alter cell wall metabolism and delay fruit softening*. Plant Sci. **242**, 195–202.
- Nara, K., Kato, Y., Motomura, Y. (2001). *Involvement of terminal-arabinose and -galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage*. Postharvest Biol. Technol. **22**, 141–150.
- Nardi, C., Escudero, C., Villarreal, N., Martínez, G., Civello, P.M. (2013). *The carbohydrate-binding module of *Fragaria × ananassa* expansin 2 (CBM-FaExp2) binds to cell wall polysaccharides and decreases cell wall enzyme activities “in vitro”*. J. Plant Res. **126**, 151–159.
- Nardi, C.F., Villarreal, N.M., Rossi, F.R., Martínez, S., Martínez, G.A., Civello, P.M. (2015). *Overexpression of the carbohydrate binding module of strawberry expansin2 in *Arabidopsis thaliana* modifies plant growth and cell wall metabolism*. Plant Mol. Biol. **88**, 101–117.

- Nicol, F., His, I., Jauneau, A., Vernhettes, S., Ho, H. (1998). *A plasma membrane-bound putative endo-1, 4-β-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in Arabidopsis*. The EMBO Journal. **17**, 5563–5576.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K.C., Kubo, Y., Bennett, K. a., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latche, A., Pech, J.C., Bennett, A.B. (2007). *Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon*. J. Exp. Bot. **58**, 1281–1290.
- Obembe, O.O., Jacobsen, E., Visser, R., Vincken, J.P. (2007). *Expression of an expansin carbohydrate-binding module affects xylem and phloem formation*. African J. Biotechnol. **6**, 1608–1616.
- Obembe, O.O., Jacobsen, E., Timmers, J., Gilbert, H., Blake, A.W., Knox, J.P., Visser, R.G.F., Vincken, J.P. (2007b). *Promiscuous, non-catalytic, tandem carbohydrate-binding modules modulate the cell-wall structure and development of transgenic tobacco (Nicotiana tabacum) plants*. J. Plant Res. **120**, 605–617.
- Obenland, D.M., Crisosto, C.H., Rose, J.K.C. (2003). *Expansin protein levels decline with the development of mealiness in peaches*. Postharvest Biol. Technol. **29**, 11–18.
- Payasi, A., Mishra, N.N., Chaves, A.L.S., Singh, R. (2009). *Biochemistry of fruit softening: An overview*. Physiol. Mol. Biol. Plants **15**, 103–113.
- Perini, M.A., Sin, I.N., Villarreal, N.M., Marina, M., Powell, A.L.T., Martínez, G.A., Civello, P.M., 2017. *Overexpression of the carbohydrate binding module from Solanum lycopersicum expansin 1 (Sl-EXP1) modifies tomato fruit firmness and Botrytis cinerea susceptibility*. Plant Physiol. Biochem. **113**, 122–132.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011). *SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions*. Nat. Methods **8**, 785–786.
- Pombo, M. a, Zheng, Y., Fernandez-Pozo, N., Dunham, D.M., Fei, Z., Martin, G.B. (2014). *Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the Epk1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins*. Genome Biol. **15**, 492.

- Poole, D.M., Hazlewood, G.P., Huskisson, N.S., Virden, R., Gilbert, H.J. (1993). *The role of conserved tryptophan residues in the interaction of a bacterial cellulose binding domain with its ligand*. FEMS Microbiol. Lett. **106**, 77–83.
- Prance, G. y Nesbitt, M. (2006). *The cultural history of plants*. Routledge. Taylor & Francis e-Library. (Eds.: Prance, G. y Nesbitt, M.) ISBN 0-203-02090-1.
- Redgwell, R.J., Fry, S.C. (1993). *Xyloglucan Endotransglycosylase Activity Increases during Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) Ripening (Implications for Fruit Softening)*. Plant Physiol. **103**, 1399–1406.
- Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Guyot, J.P., Sanchez, S. (2005). *Starch-binding domain affects catalysis in two *Lactobacillus*  $\alpha$ -amylases*. Appl. Environ. Microbiol. **71**, 297–302.
- Rose, J.K.C., Lee, H.H., Bennett, A.B. (1997). *Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 5955–5960.
- Rose, J.K.C., Bennett, A.B. (1999). *Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening*. Trends Plant Sci. **4**, 176–183.
- Rose, J.K.C., Cosgrove, D.J., Albersheim, P., Darvill, A.G., Bennett, A.B. (2000). *Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny*. Plant Physiol. **123**, 1583–1592.
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A. (2004). *Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening*. Plant Physiol. Biochem. **42**, 823–831.
- Rosli, H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A. (2009).  *$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from strawberry fruit: Cloning of three cDNAs, characterization of their expression and analysis of enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness*. Plant Physiol. Biochem. **47**, 272–281.
- Roy, S., Vian, B. and Roland, J.C. (1992). *Immunocytochemical study of the deesterification patterns during cell wall autolysis in the ripening of cherry tomato*. Plant Physiol. Biochem. **30**: 139–146

- Safra-Dassa, L., Shani, Z., Danin, A., Roiz, L., Shoseyov, O., Wolf, S. (2006). *Growth modulation of transgenic potato plants by heterologous expression of bacterial carbohydrate-binding module*. Mol. Breed. **17**, 355–364.
- Saloheimo, A., Henrissat, B., Hoffren, A.M., Teleman, O., Penttilä, M. (1994). *A novel, small endoglucanase gene, eg15, from Trichoderma reesei isolated by expression in yeast*. Mol. Microbiol. **13**, 219–228.
- Sampedro, J., Cosgrove, D.J. (2005). *The expansin superfamily*. Genome Biol. **6**, 242.
- Sampedro, J., Carey, R.E., Cosgrove, D.J. (2006). *Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: New insights from the poplar genome and pine ESTs*. J. Plant Res. **119**, 11–21.
- Schlager, B., Straessle, A., Hafen, E. (2012). *Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression*. BMC Biotechnol. **12**, 95.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. (2012). *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat. Methods **9**, 671–675.
- Schröder, R., Wegrzyn, T.F., Bolitho, K.M., Redgwell, R.J. (2004). *Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants*. Planta **219**, 590–600.
- Shackel, K.A., Greve, C., Labavitch, J.M., Ahmadi, H. (1991). *Cell Turgor Changes Associated with Ripening in Tomato Pericarp Tissue*. Plant Physiol. **97**, 814–816.
- Shah, P., Powell, A.L.T., Orlando, R., Bergmann, C., Gutierrez-Sanchez, G. (2012). *Proteomic analysis of ripening tomato fruit infected by botrytis cinerea*. J. Proteome Res. **11**, 2178–2192.
- Shcherban, T.Y., Shi, J., Durachko, D.M., Guiltinan, M.J., McQueen-Mason, S.J., Shieh, M., Cosgrove, D.J. (1995). *Molecular cloning and sequence analysis of expansins.- a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92**, 9245–9249.
- Shin, J.-H., Jeong, D.-H., Park, M.C., An, G. (2005). *Characterization and transcriptional expression of the alpha-expansin gene family in rice*. Mol. Cells **20**, 210–218.

- Shoseyov, O., Shani, Z., Levy, I. (2006). *Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**, 283–95.
- Showalter, A.M. (1993). *Structure and function of plant cell wall proteins*. Plant Cell **5**, 9–23.
- Sigrist, C.J.A., De Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., Xenarios, I. (2013). *New and continuing developments at PROSITE*. Nucleic Acids Res. **41**, 1–4.
- Sin, I.N., Perini, M. a., Martínez, G.A., Civello, P.M. (2016). *Analysis of the carbohydrate-binding-module from *Fragaria x ananassa*  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase 1*. Plant Physiol. Biochem. **107**, 96–103.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006) Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. (Eds.: Taiz, L. and Zeiger, E.). 764 pages.
- Tateishi, A., Kanayama, Y., Yamaki, S. (1996).  *$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits*. Phytochemistry **42**, 295–299.
- Thompson, J.E., Fry, S.C. (2000). *Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells*. Planta **211**, 275–286.
- Tong, C.B.S., Gross, K.C. (1988). *Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening*. Physiol. Plant. **74**, 365–370.
- Trivedi, P.K., Nath, P. (2004). *MaExp1, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit*. Plant Sci. **167**, 1351–1358.
- Van Kan, J.A.L. (2006). *Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen*. Trends Plant Sci. **11**, 247–253.
- Varner, J.E., Lin, L.-S. (1989). *Plant cell wall architecture*. Cell **56**, 231–239.
- Vaughan J. G. y Geissler C. A. (2009). *The new Oxford book of food plants*. Oxford university press. (Eds.: Vaughan J. G. y Geissler C. A.). ISBN 978-0-19-954946-7.
- Viteri, M.L., Ghezán, G. y Igklesias, D. (2013). *Tomate y Lechuga: producción, comercialización y consumo. Estudio socioeconómico de los sistemas*

- 
- agroalimentarios y agroindustriales*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (Eds.: Viteri, M.L., Ghezán, G. y Igkiesias, D.). ISSN1852-4605
- Waldron, K.W., Parker, M.L., Smith, A.C. (2003). *Plant Cell Walls and Food Quality*. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **2**, 128–146.
- Wallace, G. y Fry, S.C. (1982). *Phenolic components of the primary cell wall*. Biochem J **203**, 493–504.
- Whitney, S.E.C., Gidley, M.J., Mcqueen-mason, S.J. (2000). *Probing expansin action using cellulose/hemicellulose composites*. Science **22**, 327-334.
- Wu, Y. Thorne, E.T., Sharp, R.E., Cosgrove, D.J. (2001). *Modification of Expansin Transcript Levels in the Maize Primary Root at Low Water Potentials*. Plant Physiol. **126**, 1471–1479.
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T., Nagamune, T. (2013). *Protein refolding using chemical refolding additives*. Biotechnol. J. **8**, 17–31.
- Yennawar, N.H., Li, L.C., Dudzinski, D.M., Tabuchi, A., Cosgrove, D.J. (2006). *Crystal structure and activities of EXPB1 (Zea m 1), a beta-expansin and group-1 pollen allergen from maize*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **103**, 14664–14671.